

SÉRIE A, N° 4437.

N° D'ORDRE : 3365.

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

ADRIEN PIERRE JOLIOT

1^{re} THÈSE. — « CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES PHÉNOMÈNES D'INDUCTION DE
LA PHOTOSYNTHÈSE . »

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 30 juin 1960 devant la Commission d'examen

M. WURMSER,

Président.

M. TONNELAT,

M^{lle} QUINTIN.

} *Examineurs.*

CHARTRES
IMPRIMERIE DURAND

9, RUE FULBERT, 9

—
1961

1960

SÉRIE A, N° 4437.

N° D'ORDRE : 3365.

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

ADRIEN PIERRE JOLIOT

1^{re} THÈSE. — « CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES PHÉNOMÈNES D'INDUCTION DE
LA PHOTOSYNTHESE . »

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 30 juin 1960 devant la Commission d'examen

M. WURMSER, *Président.*

M. TONNELAT, }
M^{lle} QUINTIN. } *Examineurs.*

CHARTRES
IMPRIMERIE DURAND

9. RUE FULBERT, 9

—
1961

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PROFESSEURS

Doyen J. PÉRÈS.

G. JULIA	T	Analyse supérieure et Algèbre supér.	NORMANT	T	Synthèse organique.
DE BROGLIE	T	Théories physiques	BÉNARD	T	Chimie minérale.
PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparées.	BUVAT	T	Botanique (E.N.S.).
PÉRÈS	T	Mécanique des fluides et applications.	DUGUÉ	T	Statistiques mathématiques.
BARRABÉ	T	Géologie structurale et Géologie appliquée.	GELOSO	T	Chimie (S.P.C.N.).
BOURCART	T	Géogr. physique et Géol. dynamique.	SOULAIRAC	T	Psychophysiologie.
PLANTFOL	T	Botanique.	ULRICH	T	Physiologie végétale.
GRASSÉ	T	Évolution des êtres organisés.	MARÉCHAL	T	Optique théorique et appliquée.
PRÉVOST	T	Chimie organique.	KIRRMANN	T	Théories chimiques.
BOULIGAND	T	Application de l'analyse à la Géométrie.	CHADEFAUD	T	Botanique.
CHAUDRON	T	Chimie appliquée.	M ^{lle} LE BRETON	T	Physiologie générale.
WYART	T	Minéralogie.	SALEM	T	Mathématiques générales.
TEISSIER	T	Zoologie.	LELONG	T	Mathématiques générales.
MANGENOT	T	Biologie végétale.	DEVILLERS	T	Anatomie et Histologie comparées.
P. AUGER	T	Physique quantique et Relativité.	EHRESMANN	T	Topologie algébrique.
MONNIER	T	Physiologie générale.	FRANÇON	T	Physique (S.P.C.N.).
PIVETEAU	T	Paléontologie.	GLANGEAUD	T	Géographie physique et Géologie dynamique.
ROCARD	T	Physique (E.N.S.).	GODEMENT	T	Mathématiques (M.G.P.).
H. CARTAN	T	Mathématiques (E.N.S.).	PISOT	T	Techniques mathématiques de la Physique.
LAFFITTE	T	Chimie générale.	E. ROCH	T	Géologie.
FAVARD	T	Géométrie supérieure.	SCHATZMANN	T	Astrophysique.
COULOMB	T	Physique du Globe.	TERMIER	T	Paléontologie stratigraphique.
M ^{lle} COUSIN	T	Biologie animale (S.P.C.N.).	ZAMANSKY	T	Mathématiques générales.
CHRÉTIEN	T	Chimie minérale.	LENNUIER	T	Physique (M.G.P.).
P. DRACH	T	Zoologie.	RIZET	T	Génétique.
KASTLER	T	Physique (E.N.S.).	ROUTHIER	T	Géologie appliquée.
EPHRUSSI	T	Génétique.	M ^{me} TONNELAT	T	Relativité.
WURMSER	T	Biologie physicochimique.	DIXMIER	T	Mathématiques (M.P.C.).
RIVIÈRE	T	Géologie (S.P.C.N.) Orsay.	SOUCHAY	T	Chimie générale.
GAUTHERET	T	Biologie végétale (P.C.B.).	AIGRAIN	T	Électrotechnique générale.
LUCAS	T	Recherches physiques.	BRUSSET	T	Chimie minérale.
A. THOMAS	T	Biologie cellulaire.	M. LÉVY	T	Physique théorique des hautes énergies.
ARNULF	T	Optique appliquée.	M ^{me} CHAIX	T	Chimie biologique.
M. MORAND	T	Enseignement de Physique.	M ^{me} HUREL-PY	T	Biologie végétale (P.C.B.).
SOLEILLET	T	Physique (P.C.B.).	PIAUX	T	Chimie (M.P.C.).
FORTIER	T	Mécanique expérimentale des fluides.	BRUN	T	Mécanique expérimentale des fluides.
DANJON	T	Astronomie.	LEDERER	T	Chimie biologique.
PETIT	T	Biologie maritime.	M ^{me} DUBREIL	T	Mathématiques.
QUENEY	T	Météorologie et dynamique atmosphérique.	M ^{me} LELONG	T	Mathématiques (E.N.S.).
GALLIEN	T	Embryologie.	BELLAIR	T	Géologie (S.P.C.N.).
EICHHORN	T	Biologie végétale (S.P.C.N.).	COTTE	T	Physique (Orsay).
DE CUGNAC	T	Biologie végétale (S.P.C.N.).	J. E. DUBOIS	T	Chimie organique.
M ^{lle} CAUCHOIS	T	Chimie Physique.	LAMOTTE	T	Zoologie (E.N.S.).
THELLIER	T	Physique du Globe.	A. MICHEL	T	Chimie (S.P.C.N.).
L'HÉRITIER	T	Génétique.	OLMER	T	Énergétique générale.
GRIVET	T	Radioélectricité.	ROUAULT	T	Physique générale.
PONCIN	T	Mécanique générale.	GAUTHIER	T	Mécanique appliquée.
DUBREIL	T	Arithmétique et théorie des nombres.	BARCHEWITZ	T	Chimie physique.
QUELET	T	Chimie organique.	BROSSEL	T	Physique atomique.
CAGNIARD	T	Géophysique appliquée.	BUSER	T	Physiologie comparée.
CHAMPETIER	T	Chimie macromoléculaire.	CAMUS	T	Physiologie végétale (3 ^e Cycle).
CUVILLIER	T	Micropaléontologie.	CASTAING	T	Physique générale.
JUNG	T	Pétrographie.	CURIEN	T	Minéralogie et cristallographie.
TRILLAT	T	Microscopie et diffract. électronique.	MOYSE	T	Physiologie végétale (Orsay).
WIEMANN	T	Chimie organique et structurale.	PANNETIER	T	Chimie (S.P.C.N.).
JACQUINOT	T	Spectroscopie et Physique céleste.	POSSOMPES	T	Zoologie.
VASSY	T	Physique de l'atmosphère.	PULLMANN	T	Chimie théorique.
DESTOUCHES	T	Théories physiques.	TEILLAC	T	Physique nucléaire et radioactivité.
PRUVOST	T	Géologie.	TONNELAT	T	Biologie physicochimique.
AMIEL	T	Chimie générale.	VILLE	T	Économétrie.
HOCART	T	Minéralogie.	WILLEMART	T	Chimie (P.C.B.).
J. P. MATHIEU	T	Physique (Orsay).	DODÉ	T	Chimie (S.P.C.N.) (Orsay).
COUTEAUX	T	Biologie animale (P.C.B.).	FREYMANN	T	Physique générale.
MAY	T	Zoologie (Orsay).	GUINOCHET	T	Biologie végétale (Orsay).
CHOQUET	T	Théorie des fonctions et Topologie.	ROLLET	T	Chimie (P.C.B.).
FELDMANN	T	Biologie végétale marine.	M ^{me} JOSIEN	T	Chimie (P.C.B.).
GUINIER	T	Physique des solides.	CHEVALLEY	T	Géométrie algébrique et théorie des groupes.
JOST	T	Physiologie comparée.	ARNOULT	T	Électronique.
FORTET	T	Calcul des probabilités et Physique mathématique.	CHAPELLE	T	Physique (M.P.C.) (Orsay).
SCHWARTZ	T	Calcul différentiel et intégral.	DELANGE	T	Mathématiques (Orsay).
CHOUARD	T	Physiologie végétale.	DENY	T	Mathématiques (M.G.P.).
MALAVARD	T	Aviation.	GERMAIN	T	Mécanique théorique des fluides.
BRELOT	T	Calcul différentiel.	G. LUCAS	T	Géologie.



ALLARD	Chimie physique.	BERTEIN	Électronique.
BERTHELOT	Phys. nucl. et radioactivité.	BOUSSIÈRES	Chimie des radioéléments.
BRICARD	Météorologie et physique de l'atmosphère.	M ^{me} COUTURE	Physique (P.C.B.).
M ^{me} ALBE-FESSARD	Psychophysiologie.	ELLENBERGER	Géologie structurale et géologie appliquée.
FRIEDEL	Physique des solides.	FRANC	Biologie animale.
M. JULIA	Étude des molécules organiques complexes.	SCHNELL	Botanique tropicale.
LENDER	Biologie animale (S.P.C.N.) (Orsay).	STOLKOWSKI	Physiologie générale.
MAGAT	Physico-chimie des rayonnements.	ACHER	Chimie biologique (Orsay).
M ^{lle} QUINTIN	T Électrochimie.	BAUDOIN	Biologie animale (P.C.B.).
MONOD	T Chimie du métabolisme.	BEAUMONT	Biologie animale (S.P.C.N.).
BENOIT	T Physiologie animale.	BLAMONT	Géophysique ionosphère.
DE POSSEL	T Analyse numérique.	BOURREAU	Biologie végétale S.P.C.N. (Orsay).
CHARLOT	T Chimie analytique.	D. CURIE	Physique (M.G.P.).
HAISSINSKY	T Radiochimie.	DURAND-DELGA ..	Géologie.
LEMÉE	T Physiologie (B.M.P.V.).	FRÉON	Chimie (P.C.B.).
GUÉRIN	T Chimie (M.P.C.).	HELLER	Physiologie végétale.
M. CHATELET	Chimie (S.P.C.N.).	TORTRAT	Calcul des probabilités.
JEAN	Physique nucléaire et radioactivité.	CAILLEUX	Géologie (S.P.C.N.).
MATTLER	Physique (S.P.C.N.).	MAGNAN	Physique (M.P.C.).
L. MICHEL	Physique théorique des hautes énergies.	DAUDEL	Mécanique ondulatoire appliquée à la chimie théorique et à la physique nucléaire.
RUMPF	Chimie (P.C.B.)	M ^{lle} FOURCROY ...	Biologie végétale (S.P.C.N.).
BERGERARD	Zoologie (Orsay).		

Secrétaire général..... C. MONIER.

Ce travail a été effectué dans le laboratoire de Biologie Physicochimique de la Faculté des Sciences de Paris au titre d'Attaché de Recherches du Centre National de la Recherche Scientifique.

J'ai largement profité des moyens mis à ma disposition par l'Institut de Biologie Physicochimique et une part importante de mon appareillage provient de subventions accordées au laboratoire par la Fondation ROCKEFELLER.

Je tiens à exprimer à M. le Professeur René WURMSER, qui a dirigé ce travail, toute mon affection et ma gratitude. J'ai constamment bénéficié de ses conseils et de ses suggestions et je lui dois d'avoir pu achever ce travail dans des circonstances difficiles.

Je remercie M. le Professeur Jacques TONNELAT dont les conseils m'ont été précieux tant du point de vue technique que pour l'interprétation de mes résultats.

Je tiens également à remercier tous les travailleurs du laboratoire pour l'amitié qu'ils m'ont toujours témoignée; en particulier M^{lle} Sylvanie GUINAND a guidé mes premiers pas dans la recherche et M. Jean LAVOREL m'a initié à l'étude de la photosynthèse et m'a fait profiter de sa grande expérience.

J'ai une très grande reconnaissance pour mon ami René DELOSME qui, au cours de notre travail commun, m'a si généreusement apporté son concours. Mes remerciements vont aussi à M. le Professeur BOULIGAND qui a bien voulu m'aider dans la résolution de certains problèmes qui seront posés au cours de ce travail et à M. Michel LANGEVIN dont les conseils techniques m'ont été particulièrement précieux.

Je n'oublie pas la collaboration efficace que m'ont apportée MM. BATON, RAISONVILLE, LAMY et LE GAL dans la réalisation de l'appareillage nécessaire, M^{me} Jacqueline ZALTA et M. L. SAGAERT qui ont assuré la culture des algues et M^{lle} D. WAECKERLÉ qui m'a beaucoup aidé dans la publication de ce travail.

Je tiens enfin à exprimer ma gratitude à M. le Lieutenant-Colonel NARDI, commandant le 610^e G.E.I.A.S., qui m'a accordé le maximum de facilités pour me permettre de soutenir cette thèse pendant la durée de mon service militaire.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

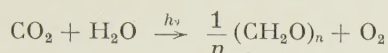
https://archive.org/details/IA41556011_0016

A LA MÉMOIRE DE MES PARENTS

A Monsieur le Professeur RENÉ WURMSER

INTRODUCTION

Le phénomène qui constitue la photosynthèse chlorophyllienne peut se représenter par l'équation



Malgré la simplicité de cette équation, il est apparu depuis longtemps que le processus photosynthétique mettait en jeu un ensemble très complexe de réactions chimiques qui peuvent se classer en deux catégories : celles qui, nécessitant un apport d'énergie lumineuse, sont de type photochimique, et celles qui, préparant ou transformant les produits photochimiques, sont susceptibles de se produire à l'obscurité. BLACKMANN a pu montrer que, pour des valeurs croissantes de l'éclairement de la plante, la vitesse de photosynthèse était successivement limitée par l'une puis l'autre de ces catégories de réactions. Pour les faibles intensités lumineuses, la vitesse de la photosynthèse est proportionnelle à l'intensité et indépendante de la température. Pour les fortes intensités lumineuses, la vitesse de la photosynthèse atteint une valeur maximum indépendante de la lumière mais qui varie avec la température, le coefficient de température étant du même ordre que celui d'un très grand nombre de réactions chimiques ordinaires.

Les réactions obscures de la photosynthèse ont été les plus étudiées. L'école de CALVIN a élucidé en grande partie le mécanisme de fixation photosynthétique du gaz carbonique, qui met en jeu des réactions biochimiques analogues à celles qui interviennent dans le métabolisme des glucides. Les réac-

tions qui conduisent à la libération de l'oxygène sont beaucoup moins connues. On sait toutefois que l'oxygène dégagé provient exclusivement de l'eau et non du gaz carbonique. Quant à la réaction photochimique, le grand nombre d'hypothèses formulées à son sujet suffit à montrer notre ignorance de ses caractéristiques essentielles.

Le présent travail porte essentiellement sur l'étude de la cinétique de la photosynthèse pendant les périodes transitoires consécutives à une brusque variation de l'éclairement des algues.

Je me suis plus particulièrement attaché à l'étude des échanges d'oxygène pendant les premières secondes qui suivent une variation d'éclairement et qui précèdent la période d'induction proprement dite. Il a donc été nécessaire de mettre au point une technique de dosage extrêmement rapide et sensible.

Outre la découverte de HILL, un apport essentiel dans les travaux de ces trente dernières années est dû à EMERSON et ARNOLD qui ont introduit la conception d'une unité photosynthétique en se fondant sur des expériences effectuées avec des séries d'éclairs lumineux. Un de mes buts a été de relier les données d'EMERSON aux résultats d'études en lumière continue. J'ai pu y parvenir grâce à la sensibilité de ma technique, qui autorise des mesures avec des éclairs isolés.

On ne trouvera dans ce travail que les références en relation directe avec mes propres recherches, l'ouvrage classique de RABINOWITCH (1) rendant superflue une bibliographie extensive.

CHAPITRE PREMIER

PREMIÈRE PARTIE

TECHNIQUE DE DOSAGE AMPÉROMÉTRIQUE DE L'OXYGÈNE

La partie technique de ce travail comporte essentiellement la mise au point d'une méthode de dosage permettant de suivre, dans un intervalle de temps très petit, les variations de l'activité photosynthétique d'algues unicellulaires. Un certain nombre de techniques accessoires seront exposées à la fin de ce chapitre.

I. — Choix d'une méthode.

L'activité photosynthétique d'une plante se manifeste dans le milieu extérieur par une absorption de gaz carbonique et une émission d'oxygène. Il existe pour doser ces deux gaz, un grand nombre de méthodes qui permettent d'étudier la cinétique de la photosynthèse à l'état stationnaire, mais ce travail porte plus particulièrement sur l'étude des phases transitoires de la photosynthèse qui suivent une brusque variation de l'éclairement de la plante. Il est alors nécessaire de suivre très rapidement les variations de l'activité intracellulaire. La rapidité de réponse de la plupart des méthodes de dosage est limitée par la vitesse de diffusion des gaz du milieu cellulaire vers le milieu de dosage. En particulier, dans le cas des méthodes de dosage en phase gazeuse, l'équilibre des concentrations de gaz de la phase liquide et de la phase gazeuse est toujours lent à s'établir. Il est donc préférable de doser l'oxygène et le gaz carbonique en solution. En ce qui concerne ce dernier, on ne dispose actuellement que des mesures de pH. De telles mesures demandent que soit réalisé l'équilibre entre le gaz carbonique dissous, l'acide carbonique et les ions bicarbonate; de plus, la réponse des électrodes de verre n'est jamais très rapide.

Par contre, l'oxygène dissous peut être dosé par une méthode sensible, l'ampérométrie, qui met en jeu des réactions électrochimiques très rapides. Cette technique a déjà été appliquée à l'étude de la photosynthèse par différents auteurs. Je me suis attaché à l'améliorer en adaptant plus étroitement la méthode des dosages ampérométriques à l'étude de la photosynthèse.

II. — Principe des dosages ampérométriques de l'oxygène.

La méthode des dosages polarographiques et ampérométriques due à HEYROWSKY⁽²⁾ est applicable à la plupart des substances dissoutes susceptibles de réagir électrochimiquement. La monographie de KOLTHOFF et LINGANE⁽³⁾ expose d'une manière très complète l'essentiel des problèmes posés par ces méthodes de dosage. J'exposerai brièvement le principe des dosages ampérométriques de l'oxygène.

Une électrode plongée dans une solution contenant de l'oxygène dissous et portée à un potentiel suffisamment négatif par rapport à la solution, est susceptible de réduire l'oxygène. Le phénomène peut être étudié quantitativement à l'aide du montage suivant : deux électrodes sont plongées dans une solution contenant un électrolyte et de l'oxygène. L'une des électrodes est impolarisable, afin que son potentiel par rapport à la solution soit bien défini. La seconde électrode est constituée par un métal noble. Les deux électrodes sont reliées par un conducteur comprenant un galvanomètre. Une pile reliée à un montage potentiométrique permet de porter l'électrode de métal noble à un potentiel donné par rapport à l'électrode impolarisable et donc par rapport à la solution. Le diagramme exprimant les valeurs de l'intensité du courant électrochimique qui traverse le circuit, en fonction du potentiel appliqué, peut être représenté schématiquement par quatre segments rectilignes successifs (fig. 1).

1) Le potentiel appliqué (exprimé par rapport à une électrode normale à hydrogène) est inférieur au potentiel correspondant à l'équilibre



aucune réaction n'a lieu aux électrodes et aucun courant ne traverse le circuit (segment 1).

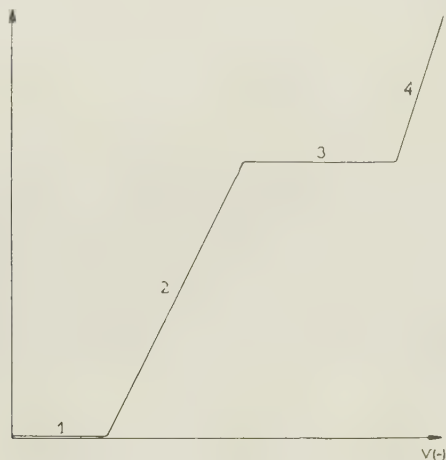


Fig. 1.

2) Le potentiel appliqué s'abaisse suffisamment pour que la réduction de l'oxygène soit thermodynamiquement possible. Un courant va traverser le circuit avec une intensité proportionnelle à la quantité d'oxygène réduite par unité de temps (loi de Faraday). La concentration d'oxygène va diminuer autour de l'électrode et il s'établira un état de régime entre la vitesse de consommation d'oxygène à l'électrode et la vitesse de diffusion de l'oxygène de la solution vers l'électrode; la vitesse de diffusion est elle-même proportionnelle au gradient de concentration existant entre la solution et la région de l'électrode (segment 2).

3) Si l'on abaisse progressivement le potentiel appliqué, la vitesse de consommation d'oxygène à l'électrode augmente ainsi que l'intensité du courant électrochimique. Parallèlement la concentration d'oxygène à proximité immédiate de l'électrode diminue, jusqu'à devenir négligeable devant la concentration d'oxygène dans la solution. La vitesse de diffusion d'oxygène, et par suite l'intensité du courant qui lui est proportionnelle, atteint une valeur maximum. Le diagramme présente un palier où l'intensité du courant est indépendante du potentiel appliqué. L'électrode négative est polarisée au maximum (segment 3).

4) Le potentiel de l'électrode négative atteint le potentiel de décomposition de l'eau. L'intensité du courant électrique croît brusquement (segment 4).

Pour un potentiel appliqué correspondant au palier

du polarogramme, l'intensité du courant électrochimique est limitée par la vitesse de diffusion de l'oxygène qui est proportionnelle à la concentration d'oxygène dans la solution. Il est ainsi possible d'utiliser un tel montage pour doser la concentration d'oxygène en solution.

La méthode des dosages ampérométriques est applicable à la plupart des substances susceptibles d'être oxydées ou réduites à une électrode portée à un potentiel convenable. Si la solution contient plusieurs substances réagissant avec l'électrode au même potentiel, l'intensité du courant électrochimique est égale à la somme des intensités qui seraient observées si chacune de ces substances était dissoute isolément. Dans le cas des dosages d'oxygène, si la solution contient des corps chimiques qui sont réduits à l'électrode en même temps que l'oxygène, ils seront la cause d'un courant supplémentaire dont on déterminera la valeur en l'absence d'oxygène dissous. Pour que le dosage d'oxygène soit possible, il est nécessaire que la concentration de ces substances parasites soit constante. C'est une des principales limitations de la méthode.

Un très grand nombre de facteurs interviennent pour définir l'intensité du courant électrochimique, parce que les réactions d'oxydoréduction ne se produisent pas à l'électrode dans des conditions réversibles. Parmi ces facteurs, il faut citer la nature chimique de l'électrode polarisable et l'état de sa surface, la géométrie de la cuve et de l'électrode et l'état d'agitation de la solution. Il est pratiquement impossible de prévoir quantitativement l'influence de ces différents facteurs, et seule une étude expérimentale permet de définir les caractéristiques d'un dispositif ampérométrique.

III. — Dosage ampérométrique appliqué aux mesures d'activité photosynthétique.

J'étudierai successivement les principaux problèmes posés par la réalisation d'un appareil de dosage ampérométrique d'oxygène, destiné aux mesures d'activité photosynthétique.

1. Choix d'un matériel biologique.

Les caractéristiques d'un appareil ampérométrique destiné à l'étude de la photosynthèse sont conditionnées en grande partie par la nature du matériel biologique choisi. Parmi toutes les plantes chlorophylliennes, les algues unicellulaires sont certainement celles qui se prêtent le mieux à ce genre de mesures. Une suspension d'algues est un système pratiquement homogène dont on peut définir avec précision la concentration et l'absorption. Ces sus-

pensions peuvent être étudiées dans des récipients de forme quelconque et supportent une forte agitation; de plus la petite dimension des cellules favorise les échanges avec le milieu.

L'espèce *Chlorella pyrenoidosa* a été choisie en raison d'un certain nombre de caractéristiques qui en facilitent l'étude. Citons la grande rapidité de croissance des cultures, la petite dimension des cellules et l'absence de mucilage qui évite la formation d'agglomérats de cellules. D'autre part, ces algues ont fait l'objet d'un grand nombre de travaux, ce qui permet des comparaisons utiles.

2. Dimensions et forme de la cuve électrochimique.

La précision des mesures d'activité photosynthétique faites avec un appareil ampérométrique est d'autant plus grande que les suspensions d'algues étudiées sont plus concentrées. La concentration des algues est limitée par la nécessité de conserver à la suspension un éclairage moyen suffisant. Dans certains cas il est même nécessaire que l'éclairage soit pratiquement homogène, ce qui conduit à des valeurs limites de la concentration beaucoup plus basses. La valeur maximum des concentrations est d'autant plus forte que l'épaisseur de la suspension est faible. J'ai donc été conduit à construire une cuve électrochimique de faible épaisseur dont la forme permet d'éclairer l'ensemble de la suspension.

3. Nature de l'électrode polarisable.

Le métal constituant l'électrode négative doit être suffisamment inerte chimiquement pour que les propriétés de surface de l'électrode ne varient pas au cours d'une expérience; l'électrode à goutte de mercure est le plus souvent utilisée. Les propriétés de cette électrode sont très reproductibles parce que la surface est constamment renouvelée, mais la méthode de dosage n'est pas continue. Pour répondre à cette critique, on a construit des électrodes formées par un petit jet de mercure ⁽⁴⁾, mais leur mise en œuvre dans une cuve étanche de dimensions réduites est difficile. On est alors conduit à utiliser des électrodes solides, dont l'inconvénient principal est un manque de reproductibilité dû aux variations de l'état de surface du métal. Les électrodes solides utilisées pour les dosages ampérométriques sont généralement en platine poli. Un grand nombre de solutions ont été proposées pour remédier au manque de reproductibilité de ces électrodes. Citons BRACKETT et coll. ⁽⁵⁾ qui inversent le potentiel appliqué après chaque mesure, afin de dépolariser l'électrode; les conditions de fonctionnement de cette électrode se rapprochent de celles de l'électrode à goutte de mercure et la méthode de dosage n'est pas continue.

Le procédé le plus simple consiste à étalonner l'appareil pour chaque expérience, les variations de sensibilité n'étant pas assez rapides pour introduire une erreur appréciable.

4. Electrode impolarisable.

Le circuit électrochimique doit comporter une électrode dont le potentiel par rapport à la solution est suffisamment constant, même si l'électrode débite. Une électrode au calomel communiquant avec la solution par un pont d'agar n'a pas donné de bons résultats. En effet, la résistance du pont introduit une chute de tension proportionnelle à l'intensité du courant électrochimique. Il est impossible de diminuer la résistance du pont en augmentant sa section, en raison des petites dimensions de la cuve électrochimique. Il faut donc placer l'électrode impolarisable directement dans la solution. Une électrode d'argent convient parfaitement. L'électrode étant portée à un potentiel positif par rapport à la solution, des ions Ag^+ sont libérés par l'électrode. Ces ions Ag^+ précipitent si le milieu contient des ions Cl^- . Le potentiel de l'électrode d'argent, défini par l'activité des ions Ag^+ et de l'argent métal, est constant. La présence de quelques ions Ag^+ dans la solution ne donne lieu qu'à un faible courant électrochimique. Il faut tenir compte du fait que ces ions sont susceptibles de réagir avec un certain nombre de substances dissoutes dans le milieu (par exemple, pour former des complexes solubles avec les cyanures).

5. Agitation du milieu.

L'étude du principe des dosages ampérométriques a montré que l'intensité du courant électrochimique est limitée par la vitesse de diffusion de l'oxygène vers l'électrode réductrice. Cette vitesse de diffusion est fonction de l'agitation de la solution autour de l'électrode.

a) Pour que des mesures effectuées en milieu non agité soient reproductibles et stables, il faut éliminer toutes les causes d'agitation parasite (convection thermique, vibrations mécaniques) susceptibles de perturber le processus de diffusion. Ces conditions sont difficiles à réaliser. De plus dans un milieu non agité, la zone où existe un gradient de concentration s'étend à toute la solution. Si la consommation d'oxygène à l'électrode est grande, ce qui est le cas pour les grandes sensibilités, le temps nécessaire pour atteindre l'état d'équilibre est long, et les phénomènes transitoires sont déformés.

BLINKS et SKOW ⁽⁶⁾ qui semblent avoir les premiers appliqué la méthode ampérométrique à l'étude de la photosynthèse, ont construit un appareil dont l'élec-

trode négative est formée par une plaque de platine appliquée directement sur la surface d'une feuille. La très faible épaisseur de la couche existant entre la feuille et l'électrode interdit toute agitation parasite et permet une diffusion rapide de l'oxygène: cette méthode est sensible et sa rapidité de réponse excellente ($1/10^e$ de sec). Par contre, elle est peu quantitative: l'étalonnage absolu est impossible, et la grande vitesse de consommation électrochimique de l'oxygène introduit une correction très importante sur les mesures de vitesse, correction presque impossible à calculer.

En résumé, les dosages ampérométriques en milieu non agité présentent beaucoup d'inconvénients, bien qu'ils semblent toutefois utilisables avec des cuves de très petites dimensions.

b) L'agitation du milieu de dosage a pour premier effet d'augmenter la sensibilité dans des proportions considérables (jusqu'à 50 fois), la zone de gradient de concentration autour de l'électrode étant réduite à une couche très mince. La rapidité de réponse à de brusques variations de la concentration d'oxygène est améliorée. Il est théoriquement possible d'atteindre une vitesse d'agitation suffisante pour que la vitesse de diffusion atteigne une valeur maximum et soit par suite indépendante de petites variations d'agitation, mais à ces vitesses les éléments biologiques risqueraient d'être endommagés. Aussi la vitesse d'agitation reste un facteur déterminant de la vitesse de diffusion, et doit être particulièrement régulière.

Du point de vue biologique, l'agitation des suspensions évite la sédimentation des algues, elle homogénéise les concentrations d'oxygène, enfin elle remédie dans une certaine mesure aux irrégularités de l'éclairement en permettant à chaque algue d'occuper successivement toutes les positions dans la cuve.

L'agitation du milieu par rapport à l'électrode peut être réalisée soit en agitant l'électrode (rotation, vibration), soit en agitant le milieu et en laissant l'électrode fixe. Le premier procédé demande un joint mobile, étanche, toujours difficile à réaliser; par contre l'agitation du milieu peut être obtenue à l'aide d'un agitateur entraîné magnétiquement. Cette agitation réalisera un meilleur brassage de l'ensemble de la suspension. Un certain nombre d'appareils ont été réalisés sur ce principe. Ils dérivent généralement de l'appareil de TÖDT (?). La forme compliquée, les grandes dimensions de la cuve, ainsi que la présence de l'agitateur et des électrodes au milieu de la suspension d'algues, rendent impossible l'éclairement homogène des suspensions. J'ai cherché à remédier à un certain nombre de ces inconvénients, ce qui m'a conduit à réaliser un appareil de conception très différente. Cette nouvelle technique a été décrite succinctement dans une note aux *Comptes rendus* (8).

IV. — Description de l'appareil.

1. Cuve électrochimique (fig. 2).

La cuve électrochimique est de forme cylindrique, son diamètre est de 2 cm et sa hauteur de 1 cm.

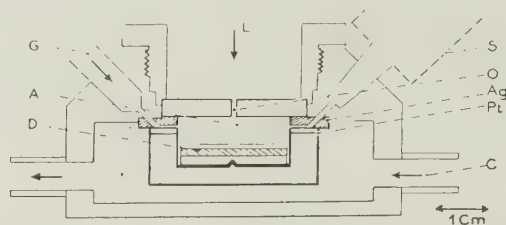


Fig. 2. — Ag, électrode d'argent; Pt, électrode de platine; S, seringue permettant le remplissage de la cuve; G, arrivée de gaz; O, orifice d'évacuation du gaz; D, disque agitateur avec son barreau d'acier; A, suspension d'algues; C, circulation d'eau à température constante.

La partie inférieure est occupée par un disque en verre de 5 mm d'épaisseur contenant un barreau d'acier. Ce disque tourne sur un pivot d'acier inoxydable: sa rotation est assurée par un aimant situé sous la cuve et entraîné par un moteur synchrone tournant à 3 000 t/mn. La paroi cylindrique de la cuve est réalisée en collant à l'araldite une feuille de platine de 5/100 de mm d'épaisseur entre deux plaques de verre. L'ensemble est ensuite percé d'un trou de 2 cm de diamètre et la paroi de la cuve ainsi formée convenablement polie. La tranche de la feuille de platine constitue l'électrode polarisable. L'électrode impolarisable est un anneau d'argent fixé sur la plaque de verre supérieure.

Les différents éléments de la cuve sont fixés sur un support en plexiglas qui sert en même temps de cuve thermostatique.

La cuve électrochimique est fermée par une plaque de verre percée en son centre d'un trou de 1 mm. Deux canaux sont percés dans l'anneau d'argent: l'un permet d'introduire dans la cuve un courant de gaz; l'autre, la suspension d'algues ou tout autre liquide contenu dans une seringue. Les bulles produites par le courant de gaz se rassemblent au centre de la cuve par suite de l'agitation et s'échappent par l'orifice percé au centre du bouchon. Les expériences s'effectuant toujours en l'absence de phase gazeuse, on arrête la circulation de gaz et on chasse les dernières bulles en introduisant par la seringue une petite quantité de suspension d'algues ou de milieu à doser. L'orifice du bouchon est alors obturé avec une lamelle de verre. Le contact électrique avec l'électrode de platine est réalisé par un fil de cuivre isolé traversant l'anneau d'argent et plongeant dans un petit canal, rempli de mercure, percé dans la partie supérieure de l'anneau de verre. L'électrode d'argent est à la masse et n'a pas besoin d'être isolée de l'eau du thermostat.

L'ensemble de ce dispositif présente un certain nombre d'avantages. La faible épaisseur de la cuve et la disposition des électrodes totalement effacées dans la paroi permettent un éclairage homogène de la suspension; l'étalonnage est rendu très facile par la possibilité de saturer la solution avec un courant de gaz de concentration d'oxygène connue; enfin, l'électrode de platine effacée dans la paroi donne de meilleurs résultats que les électrodes en fil de platine, principalement quant à la reproductibilité et à la sensibilité.

Des essais effectués dans une cuve de forme identique, mais comportant des électrodes en fil de platine, ont montré que ceux-ci se déforment et s'encrassent facilement, ce qui altère la reproductibilité des mesures. De plus, les fluctuations du courant électrochimique, principalement dues aux irrégularités d'agitation de la solution au niveau de l'électrode, sont nettement plus fortes dans le cas des fils, probablement par suite des turbulences qu'ils provoquent.

2. Circuit électrique.

Alimentation. — La tension d'alimentation de la cuve électrochimique est fournie par une pile débitant sur un potentiomètre de faible résistance (200 Ω).

Mesure du courant. — L'intensité du courant électrique est mesurée à l'aide de galvanomètres SCHLUMBERGER-PICARD à équipage immergé. Ces galvanomètres sont remarquablement peu sensibles aux perturbations mécaniques (période des galvanomètres: 1,2 et 0,5 sec., sensibilité: 5 et $7 \cdot 10^{-9}$ amp/mm). Les déplacements du spot sont enregistrés par un suiveur de spot « Photodyne » dont l'inertie est négligeable devant celle du galvanomètre. Les vitesses de déroulement du papier enregistreur sont comprises entre 1 et 30 cm/mn.

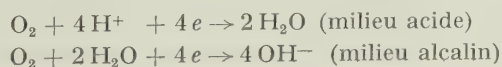
Un shunt permet de faire varier la sensibilité du galvanomètre dans le rapport de 1 à 1/220.

Renvoi de spot. — Un potentiomètre de forte résistance alimenté par une pile et branché aux bornes du galvanomètre permet de déplacer la position du zéro.

V. — Fonctionnement de l'appareil.

1. Réactions aux électrodes.

a) *Électrode négative.* — La réaction électrochimique à l'électrode de platine est probablement:



Dans le cas des électrodes de platine poli on n'observe pas le stade intermédiaire correspondant à la réduction de l'oxygène en eau oxygénée. L'absence d'eau oxygénée dans le milieu a été vérifiée par dosage avec les sels de titane. La réaction électrochimique produit des ions OH^- , ce qui oblige à tamponner le milieu de dosage assez fortement.

b) *Électrode positive.* — L'électrode d'argent libère des ions Ag^+ qui précipitent avec les ions Cl^- présents. Une petite quantité de chlorure d'argent est solubilisée par formation de complexes.

2. Préparation des électrodes.

L'état de la surface des électrodes a une grande influence sur un certain nombre de caractéristiques de l'appareil comme la valeur de l'étalonnage, les fluctuations du courant électrochimique et l'intensité du courant en l'absence d'oxygène. J'ai été conduit à essayer un certain nombre de traitements préliminaires des électrodes pour améliorer la reproductibilité des expériences. La méthode empirique de préparation des électrodes qui m'a donné les meilleurs résultats est la suivante: les électrodes sont nettoyées avec de l'ammoniaque qui dissout toutes les traces d'argent oxydé. La cuve est ensuite remplie avec une solution d'acide chlorhydrique M/10 et de chlorure de potassium concentré, une tension de 0,6 volt est appliquée aux électrodes et l'agitation magnétique mise en route. On observe un très fort courant électrochimique dû à la réduction des ions hydrogène; parallèlement, l'électrode d'argent libère une grande quantité d'ions Ag^+ dont une partie précipite à l'état de chlorure d'argent sur l'électrode, et la recouvre d'une couche régulière. Ce procédé augmente la reproductibilité des mesures et la stabilité du courant électrochimique. Cette opération n'est pratiquée qu'une seule fois pour toute une série d'expériences.

3. Polarogramme (fig. 3).

Le palier du polarogramme est très peu marqué, même quand on soustrait les valeurs du courant électrochimique en l'absence d'oxygène.

4. Courant électrochimique en l'absence d'oxygène dissous.

Pour un potentiel de 0,9 volt appliqué aux électrodes (palier du polarogramme), l'intensité du courant mesuré en l'absence d'oxygène dissous est assez forte. Il est préférable de choisir un potentiel moins élevé correspondant au début de la zone de pente

faible du polarogramme. Les dosages sont généralement effectués à 0,70 volt. Dans ces conditions, le courant de zéro est très faible, particulièrement à froid où sa valeur ne dépasse pas 1/100 de l'intensité

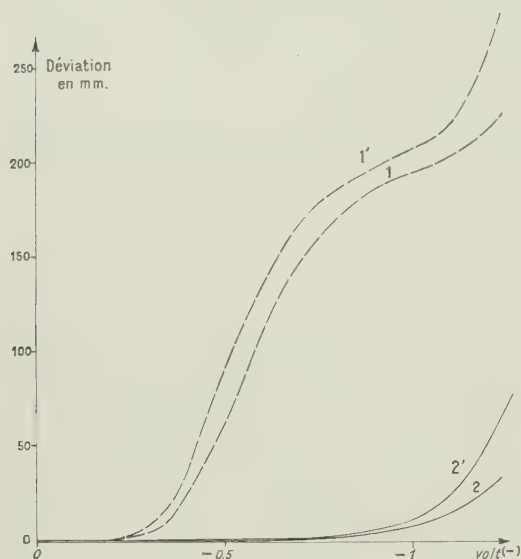


Fig. 3. — Polarogramme en présence et en l'absence d'oxygène.

1. Concentration d'oxygène : $4,05 \cdot 10^{-4}$ mole/litre. Température 4 °C.

1'. Concentration d'oxygène : $2,7 \cdot 10^{-4}$ mole/litre. Température 22 °C.

2 et 2'. Polarogramme en l'absence d'oxygène (4 °C et 22 °C).

du courant observé pour une solution saturée par l'air.

De petites variations de la tension appliquée aux électrodes donnent lieu à une brusque variation du courant de zéro qui regagne ensuite une valeur proche de la valeur initiale. Il est donc nécessaire que la tension d'alimentation soit rigoureusement constante. En particulier, le circuit électrique ne doit comporter aucune résistance susceptible de provoquer une chute de tension appréciable, ce qui limite l'emploi des amplificateurs électroniques.

5. Linéarité.

La proportionnalité de l'intensité du courant électrique à la concentration d'oxygène a été vérifiée en saturant la solution avec des mélanges gazeux dont on fait varier la concentration d'oxygène.

6. Étalonnage.

L'intensité du courant électrochimique étant proportionnelle à la concentration d'oxygène, il suffit pour étalonner l'appareil, de mesurer la valeur du

courant électrochimique pour une concentration d'oxygène connue. On sature la solution en introduisant un courant d'air comprimé par l'ajutage prévu à cet effet; la température étant connue, la concentration d'oxygène est donnée par la loi de HENRY. La valeur du courant en l'absence d'oxygène est retranchée de toutes les mesures.

La valeur de l'intensité du courant pour une solution saturée d'air est mesurée avec la sensibilité minimum permise par le shunt, soit $1/220^e$ de la sensibilité maximum. A cette sensibilité, la déviation est de l'ordre de 120 mm à 3°, soit environ $1,2 \cdot 10^{-4}$ amp. pour une concentration d'oxygène de $4 \cdot 10^{-4}$ mole/litre. Les variations d'étalonnage au cours d'une série d'expériences dépassent rarement 5 %.

7. Consommation électrochimique d'oxygène.

La loi de FARADAY donne la relation entre la quantité d'électricité qui traverse le circuit et la quantité d'oxygène réduite à l'électrode. En raison de la forte valeur de l'intensité du courant électrochimique et du petit volume de la solution, les quantités d'oxygène consommées ne sont pas négligeables devant la quantité d'oxygène présente dans la solution. Cette consommation introduit une erreur sur les déterminations de vitesse des échanges d'oxygène entre les algues et le milieu. Cette correction est facile à déterminer. La vitesse de consommation d'oxygène dO_2/dt est proportionnelle au courant électrochimique (loi de FARADAY). $dO_2/dt = ki$, ou $dO_2/dt = K\Delta$ (Δ déviation); K peut être déterminé expérimentalement en mesurant en l'absence d'algues la vitesse de consommation d'oxygène pour une déviation donnée. Dans le cas des mesures de photosynthèse, je montrerai que ces corrections sont le plus souvent sans intérêt.

8. Précision des mesures.

Quand on mesure la vitesse de variation de la concentration d'oxygène, la précision est limitée par l'indétermination sur la valeur de l'étalonnage, qui est susceptible de varier légèrement au cours d'une expérience. La précision est de l'ordre de 2 %.

9. Sensibilité.

La sensibilité peut se définir comme la plus petite variation de concentration d'oxygène décelable par la méthode. La sensibilité est limitée par les fluctuations du courant électrochimique, principalement dues aux irrégularités d'agitation au niveau de l'électrode. La valeur relative de ces fluctuations par rapport à l'intensité du courant est sensiblement

constante. La valeur absolue de ces fluctuations, exprimée en concentration d'oxygène, est donc d'autant plus petite que la concentration d'oxygène est plus basse.

La valeur des fluctuations dépend aussi de la période du galvanomètre, qui intègre plus ou moins les variations rapides du courant.

Dans les meilleures conditions, la sensibilité atteint $4 \cdot 10^{-9}$ mole/litre. On peut donc « détecter » une production de 10^{-11} mole d'oxygène dans les 2 ml de la solution.

VI. — Appareillage auxiliaire.

1. *Gaz*. — Pour saturer la solution avec un courant de gaz de composition variable, on mélange, en proportions variables, du gaz carbonique avec de l'air ou de l'azote, les débits de chacun des gaz étant mesurés à l'aide d'un gyromètre.

2. *Thermostat*. — L'eau qui circule dans l'enveloppe de la cuve électrochimique est maintenue à température constante dans un réservoir auxiliaire de 10 l environ. Un thermostat-pompe BRAUN assure la régulation de la température à 0,1 °C près, et la circulation de l'eau autour de la cellule électrochimique. Un groupe frigorifique étanche, dont le serpentin est directement plongé dans le réservoir, permet d'obtenir des températures inférieures à la température de laboratoire (jusqu'à 3° environ). La régulation de la température est toujours assurée par le thermostat BRAUN, le groupe frigorifique fonctionnant constamment.

3. *Lumière*. — La suspension d'algues est éclairée par un montage optique vertical situé au-dessus de la cuve électrochimique; il comporte une lampe à vapeur de mercure, (500 W, Philips SP 500) refroidie par eau. Les algues sont éclairées de préférence avec des lumières dont la longueur d'onde correspond aux raies du mercure. Les longueurs d'onde sont sélectionnées avec des filtres interférentiels ou des filtres Wratten. L'importance du fond continu de la lampe à vapeur de mercure haute pression permet toutefois de travailler en dehors des raies d'émission. Une lampe OSRAM à arc dans la vapeur de xénon, de 1 000 W de puissance, est utilisée pour les mesures aux très fortes énergies.

Production d'éclairs lumineux. — Pour certaines études décrites dans ce travail, il a été nécessaire d'éclairer les algues avec des éclairs isolés de durée bien déterminée, et pour lesquels les temps d'établissement et d'occultation de la lumière sont négligeables devant la durée totale de l'éclair. Ces éclairs sont isolés à partir d'une source de lumière continue

par un secteur tournant de forme semi-circulaire, entraîné par un moteur synchrone. Les éclairs successifs sont séparés par des intervalles d'obscurité égaux à la durée de l'éclair. Pour les éclairs d'une durée inférieure à 0,5 sec., il est impossible d'isoler un éclair avec un obturateur à main. Dans ce but, un second disque tourne au-dessus du premier à une vitesse dix fois plus faible. Il comporte une ouverture de 25°. Ce secteur ne laisse passer qu'un éclair sur dix du secteur rapide. Il est alors facile d'isoler manuellement un de ces éclairs. La section du faisceau lumineux au niveau du secteur rapide étant très petite devant la demi-circonférence du secteur rapide, le temps d'établissement et d'occultation de la lumière ne dépasse pas 1/60^e de la durée totale de l'éclair. Le moteur synchrone actionne les deux secteurs par un train d'engrenage dont on peut faire varier le rapport. La durée des éclairs est comprise entre 1/40^e de seconde et 2,5 sec. Afin d'obtenir des éclairs de plus courte durée, un troisième secteur tournant à grande vitesse peut être adjoint au système précédent. La durée minimum des éclairs atteint alors 3 millisecondes.

Flash électronique. — Des éclairs lumineux de très courte durée sont produits par une lampe de type LAPORTE (9). La durée de ces éclairs est de l'ordre de 100 microsecondes, et l'énergie électrique est comprise entre 5 et 50 joules suivant la capacité de la batterie de condensateurs utilisée. La lampe est placée à 3 cm de la face avant de la cuve électrochimique, sans interposition du système optique.

SECONDE PARTIE

CULTURE DES ALGUES

I. — Conditions de culture.

Les algues, *Chlorella pyrenoidosa*, sont cultivées dans des flacons de Roux de 600 ml. La forme plate de ces flacons permet un éclairage relativement homogène de la suspension d'algues. Un barbotage d'air enrichi à 5 % en gaz carbonique assure l'alimentation des algues en CO₂ et l'agitation de la suspension.

1) *Milieu de culture*. — Il est constitué par la solution de KNOP à laquelle est ajouté 1 ml par litre d'une solution d'oligoéléments (Tableaux I et II). La solution de KNOP est préparée avec de l'eau

de source qui comporte à l'état de traces un grand nombre d'oligoéléments.

TABLEAU I

Composition du milieu de culture (solution de Knop).

NO ₃ K	2,5 grammes	
SO ₄ Mg, 7 H ₂ O	5,0	—
ClNa	2,0	—
PO ₄ H ₂ K	2,5	—
SO ₄ Fe	0,003	—

pour 1 l d'eau
de puits filtrée.

TABLEAU II

Composition de la solution d'oligoéléments.

BO ₃ H ₃	2,8	grammes/litre
SO ₄ Mn, 4 H ₂ O	2,0	—
SO ₄ Zn, 7 H ₂ O	0,4	—
SO ₄ Cu, 5 H ₂ O	0,08	—
MoO ₄ (NH ₄) ₂	0,01	—
CaCl ₂	0,1	—

2) *Température.* — Les flacons de Roux sont placés dans un bain thermostaté à 22-23°.

3) *Lumière.* — Les flacons de culture sont éclairés par 6 tubes fluorescents « lumière du jour ». On diminue si besoin est cet éclairage en interposant des grilles absorbantes entre les lampes et la culture.

II. — Dosage des algues.

1) *Poids sec.* — Les algues sont centrifugées et lavées puis recueillies dans un petit tube de verre. Ce tube est porté à l'étuve à 110° pendant 24 h. Cette méthode de dosage est satisfaisante mais assez longue à mettre en œuvre. Un dosage plus rapide s'impose donc pour définir rapidement la concentration d'une suspension d'algues.

2) *Volumétrie.* — Les algues sont centrifugées dans un tube hématocrite; on détermine le volume des cellules centrifugées. On observe, suivant les conditions d'éclairage des cultures, des variations de 50 % par rapport au poids sec.

3) *Absorption.* — L'absorption des algues mesurée au spectrophotomètre est due en partie à l'absorption vraie des algues et en partie à la diffusion de la lumière par celles-ci. Les mesures d'absorption n'ont dans ces conditions qu'une valeur relative et doivent être effectuées dans des conditions géométriques rigoureusement constantes, donc avec le même spectrophotomètre et pour des fentes identiques.

Les mesures sont effectuées pour la valeur correspondant au minimum d'absorption des algues à 540 mμ. A cette longueur d'onde intervient princi-

palement l'absorption apparente due à la diffusion de la lumière. Ce sont donc en fait des mesures turbidimétriques, méthode couramment utilisée pour le dosage des bactéries. Le rapport entre l'absorption et le poids sec varie de 20 à 30 % suivant les conditions de culture.

On a défini une unité arbitraire de quantité d'algues (UA). C'est la quantité d'algues contenue dans 1 ml d'une suspension dont la densité optique, à la longueur d'onde 540 mμ, sous une épaisseur de 1 cm, est égale à l'unité.

Cette unité est équivalente, pour des cultures dans les conditions définies plus haut, à 1 mg de poids sec ± 5 %, ou environ 5 μl d'algues fraîches.

4) *Chlorophylle.* — La concentration de chlorophylle est mesurée en opérant une extraction totale des pigments par le méthanol. Après plusieurs extractions et centrifugations successives, l'extrait méthanolique est dosé au spectrophotomètre à deux longueurs d'onde, 546 et 578 mμ, pour lesquelles les coefficients d'absorption sont respectivement $4,05 \cdot 10^3$ et $7,4 \cdot 10^3$ (concentrations en g/ml).

III. — Vitesse de développement de la culture.

La vitesse de développement des algues est pratiquement exponentielle. En effet, la culture est arrêtée avant que l'absorption de la suspension ne devienne telle que l'éclairage moyen de la suspension diminue d'une façon sensible.

On peut caractériser la vitesse de croissance de la culture par le temps de doublement, appelé souvent improprement le temps de génération. Cette terminologie est impropre, car les examens microscopiques d'une culture montrent le plus souvent des figures de division par 4 ou même plus. Le temps de doublement pour les cultures en forte lumière s'abaisse jusqu'à 7 h.

Les conditions de milieu de la culture doivent être maintenues très constantes. Toute modification de celles-ci se traduit généralement par des perturbations diverses, tant au point de vue de la vitesse de croissance, que de différents autres tests physiologiques.

L'intensité de la lumière pendant la culture est un des principaux facteurs qui déterminent les caractéristiques physiologiques des algues et la vitesse de développement. En particulier, la vitesse de respiration augmente avec l'intensité de la lumière pendant la culture, alors que l'activité photosynthétique diminue. Certains aspects quantitatifs des cinétiques d'induction sont également modifiés.

La possibilité de faire varier la valeur relative de la respiration et de la photosynthèse a été mise à profit dans un grand nombre d'expériences.

TROISIÈME PARTIE

APPLICATION DE LA MÉTHODE DE DOSAGE AMPÉROMÉTRIQUE A L'ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ PHOTOSYNTHÉTIQUE

I. — Mesure des vitesses d'échanges d'oxygène entre les algues et le milieu.

Les mesures de la vitesse d'absorption ou d'émission d'oxygène par les suspensions d'algues sont effectuées en déterminant pour un intervalle de temps donné la variation de la concentration d'oxygène dans le milieu. Si la vitesse de respiration ou de photosynthèse est proche d'un état stationnaire, cet intervalle de temps peut être choisi très long et la précision des mesures n'est limitée que par l'indétermination sur la valeur de l'étalonnage; au contraire si ces vitesses varient très rapidement, ce qui est le cas pendant la phase transitoire qui suit une brusque variation de l'éclairement des algues, les mesures doivent s'effectuer sur des intervalles de temps très courts pendant lesquels les variations de concentration d'oxygène sont très faibles. La limite inférieure de l'intervalle de temps est imposée soit par la sensibilité, soit par la rapidité de réponse de l'appareil. La sensibilité de la méthode est limitée par les fluctuations du courant électrochimique, et la rapidité de réponse par la période du galvanomètre. Les fluctuations apparentes sont d'autant plus grandes que la période du galvanomètre est plus courte; la sensibilité et la rapidité de l'appareil varient donc toujours en sens contraire. Le temps de réponse de l'appareil est de l'ordre de grandeur de la période du galvanomètre utilisé (1 sec. et 1/2 sec.).

Pratiquement les mesures de vitesse s'effectuent par différenciation du courant électrochimique. Plusieurs méthodes sont utilisées.

1. Différenciation graphique. Les vitesses sont déterminées directement par mesure de la pente de la courbe exprimant la concentration d'oxygène en fonction du temps.

2. Différenciation électrique. Un montage a été réalisé qui permet de différencier électriquement le courant électrochimique à l'aide d'un circuit résistance-capacité. Ce montage a permis d'étudier la rapidité de réponse maximum de l'appareil en choisissant une constante de temps de différenciation très petite ($1/20^{\text{e}}$ de sec.) et en mesurant le courant différencié avec un galvanomètre oscillographe de $1/15^{\text{e}}$ de sec. de période dont le spot est enregistré

photographiquement. Il est nécessaire d'amplifier le courant électrochimique, ce qui pose des problèmes très complexes, les résistances de charge qu'il est possible d'introduire dans le circuit étant extrêmement faibles (quelques centaines d'ohms). Cette méthode n'a été que peu utilisée; elle permet cependant d'apprécier la rapidité de réponse de l'appareil. La figure 4 montre la grande rapidité de croissance

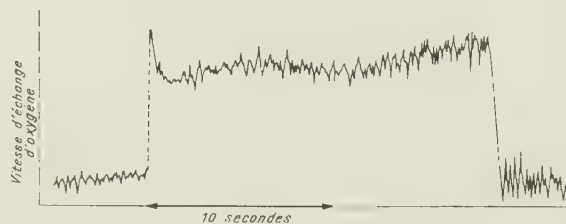


Fig. 4. — Enregistrement de la vitesse des échanges d'oxygène obtenu par différenciation électrique du courant de mesure.

Constante de temps du circuit différenciateur: $1/20^{\text{e}}$ de sec. Période du galvanomètre oscillographe: $1/15^{\text{e}}$ de sec.

de la vitesse d'émission d'oxygène lors de l'établissement de la lumière.

3. Différenciation à l'aide du suiveur de spot. Le « photodyne » comporte un enroulement tachymétrique sur le moteur du chariot suiveur de spot. La tension obtenue aux bornes de cet enroulement est proportionnelle à la vitesse de déplacement du chariot. Cette tension est appliquée aux bornes d'un galvanomètre dont le spot est enregistré photographiquement (fig. 5).

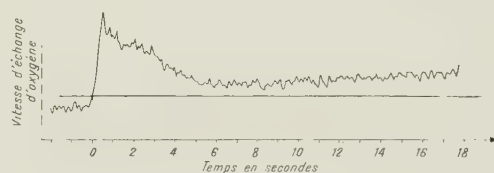


Fig. 5. — Enregistrement de la vitesse des échanges d'oxygène obtenu à l'aide du photodyne.

Concentration des algues: 4 UA/ml.

Vitesse d'émission d'oxygène au maximum initial: $4,5 \cdot 10^{-7}$ mol/litre/sec. Période du galvanomètre: 0,5 sec.

II. — Mesure des échanges d'oxygène dans les différentes conditions expérimentales.

Les expériences décrites dans ce travail portent le plus souvent sur la mesure des échanges d'oxygène pendant les phases transitoires qui suivent une brusque variation de l'éclairement des algues. Afin de diminuer au maximum l'importance des fluctua-

tions du courant électrochimique par rapport au phénomène étudié, les expériences sont effectuées de préférence aux faibles concentrations d'oxygène et sur des suspensions d'algues aussi concentrées que possible. Ces conditions ne sont pas toujours compatibles avec les exigences expérimentales. J'examinerai en fonction de quelques facteurs expérimentaux les possibilités pratiques de la méthode.

1. Facteurs de concentration (oxygène et gaz carbonique).

La vitesse de la photosynthèse stationnaire et la respiration étant indépendantes de la concentration d'oxygène dans un très large domaine, l'étude de suspensions concentrées aux basses tensions d'oxygène ne présente pas d'inconvénients majeurs. Cependant, pour les fortes vitesses de photosynthèse, la zone de sensibilité optimum est rapidement dépassée; il sera également difficile d'étudier l'activité de la photosynthèse aux basses tensions de gaz carbonique, celui-ci s'épuisant rapidement à la lumière.

2. Éclairement des algues.

L'activité photosynthétique d'une algue est fonction de la quantité de lumière qu'elle absorbe, quantité proportionnelle à l'éclairement, pour une longueur d'onde donnée. Une suspension concentrée d'algues diffuse et absorbe la lumière, et l'éclairement d'une algue dépend donc de sa position dans la cuve. Par suite de l'agitation, une algue occupe successivement toutes les positions, et son éclairement varie en fonction du temps. Par contre, la valeur moyenne de l'éclairement est identique pour toutes les algues.

L'effet sur l'activité photosynthétique de ces variations d'éclairement en fonction du temps est différent suivant que la vitesse d'émission d'oxygène est limitée par la quantité de lumière absorbée ou par des réactions thermiques susceptibles de se poursuivre à l'obscurité.

a) En faible lumière, la vitesse stationnaire de la photosynthèse est déterminée uniquement par la quantité de lumière absorbée par la suspension. Il est donc possible d'étudier des suspensions d'algues très concentrées. En particulier, les mesures de rendement quantique pourront être effectuées dans des conditions où la lumière incidente est totalement absorbée, ce qui facilite considérablement les mesures.

La mesure des vitesses d'émission d'oxygène en lumière limitante, pour différentes valeurs de la concentration de la suspension, permet d'apprécier l'importance des variations d'éclairement. Les courbes 1 et 2 de la figure 6 représentent pour deux

longueurs d'onde le rapport (vitesse d'émission d'oxygène/concentration) en fonction de la concentration pour un éclairement incident constant. Ce rapport, proportionnel à l'éclairement moyen, atteint une

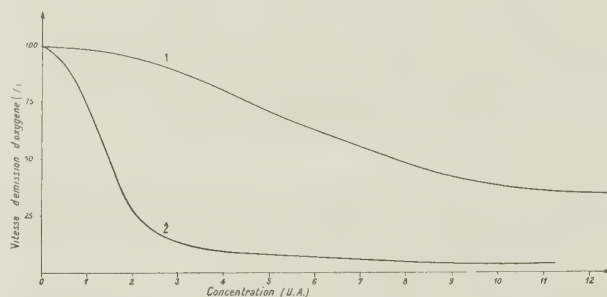


Fig. 6. — Détermination de l'éclairement moyen d'une suspension d'algues par mesure de la vitesse d'émission d'oxygène en faible lumière.

Concentration de chlorophylle: 0,035 mg/UA.

En ordonnée sont portées les vitesses d'émission d'oxygène rapportées à la concentration de la suspension. La vitesse correspondant à une solution très diluée a été prise arbitrairement égale à 100.

Courbe 1: longueur d'onde 546 mμ; courbe 2: longueur d'onde 440 mμ.

valeur maximum (100 %) pour une suspension infiniment diluée. L'éclairement moyen est alors égal à l'éclairement incident. A l'aide de telles courbes, il est possible de déterminer, pour chaque longueur d'onde, les concentrations maxima pour lesquelles l'éclairement reste pratiquement homogène. En lumière verte (courbe 1) et pour une concentration de 2 UA par ml, l'éclairement moyen atteint 95 % de l'éclairement incident. Les variations d'éclairement maximum sont alors de l'ordre de ± 5 %.

b) La vitesse d'émission d'oxygène, en forte lumière, ou en faible lumière pendant la période d'induction, est limitée par une ou plusieurs réactions thermiques susceptibles de se poursuivre à l'obscurité. Il est donc préférable d'étudier des suspensions dont l'éclairement est pratiquement homogène. Les concentrations maxima correspondantes peuvent être calculées à partir de courbes du type de la figure 6. Ces concentrations sont de l'ordre de 2 UA/ml en lumière verte, et 0,4 UA/ml en lumière bleue correspondant au maximum d'absorption.

La grande rapidité de l'agitation réduit considérablement les inconvénients des variations d'éclairement. Expérimentalement, il n'a pas été possible de montrer une influence de ces variations sur les cinétiques d'induction en faible lumière. Par contre, l'homogénéité de l'éclairement est indispensable quand on étudie l'émission d'oxygène provoquée par des éclairs lumineux dont la durée est courte devant la vitesse d'agitation. Dans ce cas, la quantité de lumière absorbée par les algues pendant la durée

d'un éclat est fonction de la position de celles-ci si la concentration de la suspension est trop forte.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) E. RABINOWITCH. — *Photosynthesis and related processes*. Interscience Publ., New York, 1941, 1951, 1956.
 - (2) J. HEYROVSKY et S. BEREZICKY. — *Coll. czech. chem. Comm.*, 1929, **1**, 19.
 - (3) I. M. KOLTHOFF et J. J. LINGANE. — *Polarography*. Interscience, 1952.
 - (4) J. HEYROVSKY et J. FOREJT. — *Z. phys. Chem.*, 1943, **193**, 77.
 - (5) R. A. OLSON, F. S. BRACKETT et R. G. CRICKARD. — *J. Gen. Physiol.*, 1949, **32**, 681.
 - (6) L. R. BLINKS et R. K. SKOW. — *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Washington, 1938, **24**, 413.
 - (7) F. TÖDT. — *Handbuch der analytischen Chemie III*, 1953, VI a, p. 24.
 - (8) P. JOLIOU. — *C. R. Acad. Sci.*, 1956, **243**, 677.
 - (9) M. LAPORTE. — *Les lampes à éclairs lumière blanche et leurs applications*, Gauthier-Villars, Paris, 1949.
-

CHAPITRE II

CINÉTIQUE D'INDUCTION DE LA PHOTOSYNTHÈSE CHEZ *CHLORELLA PYRENOIDOSA*.

I. — Étude des phases transitoires de la photosynthèse consécutives à une variation de l'éclairement.

SOMMAIRE

L'étude des cinétiques d'induction de la photosynthèse chez *Chlorella* a été effectuée à l'aide d'une technique ampérométrique de dosage de l'oxygène dissous décrite précédemment.

On a pu observer le phénomène qui a été découvert par BLINKS et SKOW sur d'autres matériels biologiques et qui se traduit par une brusque émission d'oxygène intervenant pendant les premières secondes de la période d'illumination.

La faible inertie de la méthode de dosage a permis de préciser la cinétique de ce phénomène. La vitesse d'émission d'oxygène est maximum au début de l'illumination et, pour de faibles intensités lumineuses, égale à la vitesse stationnaire de la photosynthèse.

L'étude de l'effet de variations de l'intensité lumineuse intervenant pendant la période d'induction a montré que celles-ci provoquaient toujours une variation instantanée de la vitesse d'émission d'oxygène.

Les cinétiques d'induction ont été étudiées dans diverses conditions expérimentales et en particulier en présence d'un certain nombre d'inhibiteurs. Une interprétation sommaire permettant de rendre compte de l'essentiel des faits expérimentaux est exposée à la fin de ce travail.

On sait que le processus qui constitue la photosynthèse chlorophyllienne comporte un enchaînement de réactions thermiques et photochimiques. A la suite d'une variation de l'éclairement de la plante, seule la vitesse des réactions photochimiques est instantanément modifiée. Cette variation de vitesse se répercute plus ou moins rapidement sur l'ensemble des réactions impliquées dans le processus photosynthétique. L'étude de la cinétique des réactions thermiques de la photosynthèse pendant cette phase transitoire permet d'établir certaines relations entre ces réactions et la réaction photochimique. Ce travail porte plus particulièrement sur la mesure des cinétiques des échanges d'oxygène à la suite d'une modification brusque de l'éclairement de la plante. Les cinétiques sont suivies à l'aide d'une méthode ampérométrique de dosage de l'oxygène dissous qui est décrite par ailleurs (¹, ²). La rapidité de réponse

de l'appareil est de l'ordre de 0,5 s, ce qui permet d'étudier avec un minimum de déformation les cinétiques transitoires rapides. La sensibilité atteint, dans les meilleures conditions c'est-à-dire aux basses tensions d'oxygène, $4,10^{-9}$ mole/litre.

Les expériences ont porté sur les algues *Chlorella pyrenoidosa*, cultivées dans la solution de KNOP additionnée d'oligoéléments. La concentration des suspensions d'algues est déterminée soit par mesure du poids sec, soit par des mesures de l'absorption apparente effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre. On définit une unité arbitraire (U.A.) de quantité d'algues. C'est la quantité d'algues contenue dans un ml de suspension dont la densité optique, sous une épaisseur de 1 cm, est égale à l'unité pour une longueur d'onde de 546 m μ . Les mesures doivent s'effectuer dans des conditions géométriques rigoureusement constantes. Cette unité correspond approximativement à 1 mg de poids sec (± 5 %).

Dans une première partie, j'étudierai l'effet d'une interruption de l'éclairement portant sur des algues ayant atteint une vitesse stationnaire de photosynthèse. Les cinétiques transitoires seront alors relativement simples, une diminution de vitesse de la réaction photochimique imposant une diminution presque immédiate de la vitesse de l'ensemble du processus.

Dans une seconde partie, j'étudierai l'effet d'une augmentation de l'éclairement des algues. Dans ce cas, les nombreuses réactions thermiques qui précèdent ou qui suivent la réaction photochimique doivent s'adapter à l'augmentation de vitesse de cette dernière. A cette période d'adaptation, qui peut être très longue, correspondent les phénomènes d'induction de la photosynthèse qui font l'objet essentiel de ce travail.

Des résultats préliminaires portant sur les cinétiques d'induction des algues *Chlorella* sont exposés dans une note aux Comptes Rendus (³).

PREMIÈRE PARTIE

ÉTUDE DES ALGUES EN PÉRIODE DE PHOTOSYNTHÈSE STATIONNAIRE

I. — Introduction.

La mesure de la vitesse d'émission d'oxygène consécutive au processus photosynthétique a toujours posé des problèmes très complexes, même en période de photosynthèse stationnaire. De l'existence de deux processus simultanés, photosynthèse et respiration, il résulte qu'une simple mesure de la vitesse des échanges d'oxygène ne permet pas de connaître séparément la vitesse de ces deux réactions. De nombreux auteurs ayant observé des variations de la vitesse de respiration à la suite d'une période d'illumination, il n'est pas possible d'admettre que la consommation d'oxygène par la respiration est identique à la lumière et à l'obscurité. Une grande partie des controverses sur la valeur du rendement quantique maximum de la photosynthèse sont probablement dues à la difficulté d'apprécier la vitesse de respiration pendant la période de photosynthèse. Il semble cependant logique d'admettre qu'une brusque interruption de l'éclairement modifiera plus rapidement la vitesse de production d'oxygène que la vitesse de respiration. Si l'on dispose d'une méthode de dosage suffisamment rapide, on pourra déterminer la vitesse de respiration pendant la période d'illumination en la mesurant immédiatement après une interruption de la lumière.

Avant de présenter les résultats expérimentaux, je résumerai rapidement les principales hypothèses formulées quant aux relations possibles entre la photosynthèse et la respiration.

1. La plupart des auteurs considèrent la respiration et la photosynthèse comme deux processus relativement indépendants. Si la vitesse de la respiration peut être influencée par la lumière, les variations de la respiration sont relativement faibles et apparaissent d'une manière progressive.

2. Pour WARBURG et BURK (4), la respiration est directement impliquée dans les processus photosynthétiques. Le rendement quantique instantané de la production d'oxygène serait très élevé (1 quantum par molécule d'oxygène). Une très forte augmentation de la respiration pendant la période de la photosynthèse permettrait de satisfaire aux besoins énergétiques de la réaction photosynthétique, qui correspondent au minimum à 3 ou 4 quanta par molécule d'oxygène dégagée. Cette augmentation de la vitesse de la respiration se maintiendrait un temps

suffisamment long après l'interruption de l'illumination pour qu'il soit possible de la mesurer. Il faut remarquer que dans cette hypothèse (comme dans la précédente), on considère que la vitesse de respiration ne présente pas de discontinuité au moment d'une variation de l'éclairement. Du point de vue expérimental, on devrait observer immédiatement à la suite d'une diminution de l'éclairement, une variation très considérable de la vitesse d'échange d'oxygène, correspondant en faible lumière à un rendement quantique unité.

3. Il faut enfin envisager la possibilité d'une action directe de la lumière sur la respiration, par exemple par l'intermédiaire d'une enzyme photosensible.

Une des confirmations les plus importantes de la première hypothèse est donnée par les expériences de BROWN (5) effectuées avec l'isotope 18 de l'oxygène. Le milieu de suspension des chlorelles est enrichi en $^{18}\text{O}_2$. Il devient possible de suivre l'absorption d'oxygène due à la respiration, même pendant la période de photosynthèse. Les résultats expérimentaux ne montrent pas de variation appréciable de la respiration, en particulier au début de la période d'illumination.

D'autre part BRACKETT et coll. (6), utilisant une méthode ampérométrique de dosage de l'oxygène, ont montré que la vitesse de respiration ne se modifie que lentement pendant la période de photosynthèse. Ces faits sont donc en contradiction avec les expériences de WARBURG.

II. — Résultats expérimentaux.

La figure 1 donne un exemple des cinétiques de la respiration qui s'observent après une période d'illumination.

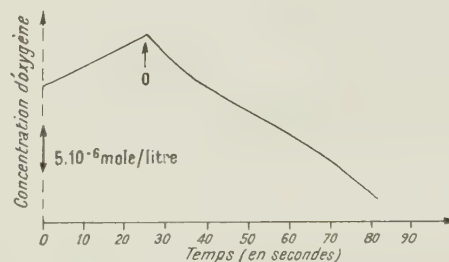


Fig. 1. — Cinétique de la respiration après une période d'illumination.

Concentration des algues : 2 UA/ml. Température : 15 °C.

1° La vitesse des échanges d'oxygène varie instantanément (à la rapidité de réponse près) après l'interruption de l'illumination. Elle atteint une nouvelle valeur qui ne subit ensuite que des variations relativement lentes,

2° La vitesse de la respiration est légèrement plus forte après une période de lumière. Elle regagne ensuite une valeur stationnaire en présentant une oscillation plus ou moins marquée. Le manque de reproductibilité de ces cinétiques rend difficile leur interprétation.

3° En aucun cas, les variations de vitesse observées ne peuvent justifier une modification du rendement quantique analogue à celle signalée par WARBURG et BURK. Pour de faibles intensités lumineuses, les variations de respiration sont le plus souvent négligeables.

4° En conclusion, si l'on suppose que la vitesse de respiration ne subit pas de variation rapide dans un laps de temps inférieur à la rapidité de réponse de l'appareil, la mesure de la vitesse d'émission d'oxygène doit s'effectuer en retranchant algébriquement les pentes du diagramme des concentrations d'oxygène avant et immédiatement après l'interruption de l'éclairement. Cette méthode sera systématiquement utilisée au cours de ce travail. Il faut remarquer qu'il n'est pas nécessaire de tenir compte de la vitesse de la consommation électrochimique d'oxygène, celle-ci pouvant être considérée comme identique immédiatement avant et après l'interruption de la lumière.

Les tableaux I et II montrent que la vitesse d'émission d'oxygène en faible lumière calculée par cette méthode, est indépendante de la température, et

TABLEAU I

Effet de la température sur la vitesse d'émission d'oxygène.

Concentration des algues : 2 UA/ml.

Concentration de chlorophylle : 0,054 g/l.

Temps de doublement : 8,7 h.

V_1 = vitesse des échanges d'oxygène immédiatement avant l'interruption de l'illumination.

V_2 = vitesse des échanges d'oxygène immédiatement après l'interruption de l'illumination.

$V = V_1 - V_2$. Les vitesses en moles/l/sec. sont multipliées par 10^7 .

Température	V_1	V_2	V
—	—	—	—
3°	+ 1,77	— 0,85	2,62
13,5°	+ 0,90	— 1,7	2,60
23,5°	— 0,20	— 2,77	2,57

proportionnelle à l'intensité lumineuse. Il n'a jamais été possible de mettre en évidence le phénomène signalé par KOK (?) qui se traduirait par une augmentation du rendement quantique pour les très faibles intensités lumineuses (vitesse de photosynthèse inférieure au point de compensation).

TABLEAU II

Effet de l'intensité lumineuse sur la vitesse d'émission d'oxygène.

Concentration des algues : 2 UA/ml.

Concentration de chlorophylle : 0,044 g/l.

Temps de doublement : 9,2 h.

Température : 8 °C.

Les intensités lumineuses I sont exprimées en unités arbitraires.

I	V_1	V_2	V	V/I
—	—	—	—	—
1	— 0,24	— 1,17	0,93	0,93
1,85	+ 0,22	— 1,48	1,70	0,92
3,5	+ 1,42	— 1,65	3,07	0,88

SECONDE PARTIE

PHÉNOMÈNES D'INDUCTION DE LA PHOTOSYNTHÈSE

I. — Introduction.

Les phénomènes d'induction de la photosynthèse ont fait l'objet d'un grand nombre d'études portant en particulier sur la cinétique des échanges gazeux. Les résultats obtenus à l'aide de techniques de dosage classiques montrent que les vitesses d'émission d'oxygène et d'absorption de gaz carbonique sont très faibles au début de l'illumination, puis croissent en suivant des oscillations plus ou moins marquées jusqu'à atteindre une valeur maximum stationnaire. Les facteurs expérimentaux qui déterminent principalement les cinétiques d'induction sont l'intensité lumineuse, la température et la durée de la période d'obscurité précédant l'illumination. Ces phénomènes sont interprétés en supposant que pendant la période d'induction une ou plusieurs réactions thermiques limitent la vitesse de la photosynthèse. Les systèmes catalytiques de ces réactions s'activent progressivement à la lumière et se désactivent à l'obscurité. En faible lumière, la vitesse de ces réactions devient suffisante pour que seule la réaction photochimique limite l'ensemble des processus.

BLINKS et SKOW⁽⁸⁾, qui disposaient d'une méthode ampérométrique de dosage de l'oxygène particulièrement rapide, ont mis en évidence une brusque émission d'oxygène, tout au début de la période d'illumination. Ce phénomène a été observé chez une plante supérieure (*Ricinus*), chez une plante aquatique (*Potamogeton*) et chez une algue (*Ulva*). Cette émission d'oxygène, dont la durée ne dépasse pas quelques secondes, échappe à la plupart des autres

méthodes de dosage. Elle a généralement été interprétée comme un phénomène secondaire correspondant par exemple à la réduction photochimique d'une substance accumulée à l'obscurité et intervenant parallèlement à la photosynthèse. J'ai pu mettre en évidence l'existence d'un jet d'oxygène chez *Chlorella pyrenoidosa* et montrer les relations étroites qui existent entre ce phénomène et la photosynthèse proprement dite.

Les cinétiques d'induction de la photosynthèse sont difficiles à interpréter en raison des variations observées suivant les conditions de culture des algues. Il est cependant possible de dégager un certain nombre de lois simples qui sont pratiquement toujours valables.

calculer, même approximativement, les quantités d'énergie absorbées par les algues, et la connaissance de la valeur absolue de l'éclairement n'aurait pas de signification utilisable. Les variations d'intensité sont obtenues à l'aide de filtres neutres étalonnés au spectrophotomètre.

c) Milieu : Tampon phosphate M/20, KCl M/10, pH 6,4; concentration de gaz carbonique : 2 % d'une solution saturée.

2. Description du phénomène (fig. 2).

La vitesse d'émission d'oxygène atteint une valeur maximum presque immédiatement après le début

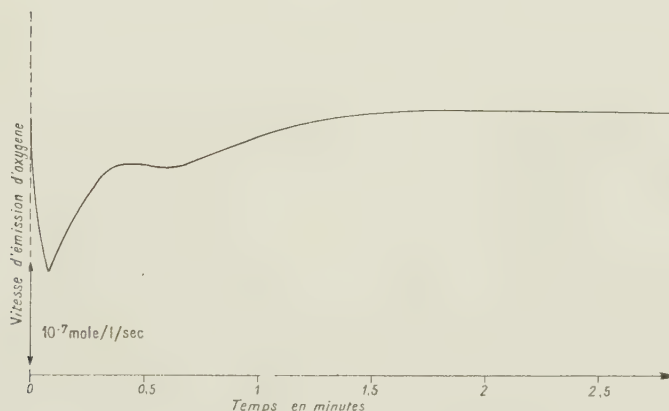


Fig. 2. — Cinétique d'induction en faible lumière.

Concentration des algues : 2 UA/ml. Concentration de chlorophylle : 0,054 g/l. Temps de doublement : 8,7 h. Température : 13 °C
Les algues ont été illuminées au temps zéro.

Une première partie sera consacrée à l'étude des effets des principaux facteurs déterminant les cinétiques d'induction. Dans une seconde partie, on comparera l'influence de quelques facteurs d'inhibition sur la photosynthèse stationnaire et sur la période d'induction.

II. — Caractéristiques essentielles des cinétiques d'induction.

1. Conditions expérimentales.

a) Les algues étudiées sont conservées à l'obscurité pendant plusieurs heures avant l'expérience, à une température identique à celle de la cellule de mesure.

b) Éclairement des algues : les algues sont éclairées avec une lumière de longueur d'onde 546 mμ. Les concentrations des suspensions permettent un éclairage relativement homogène. Il est difficile de

de l'illumination. Elle décroît ensuite dans les premières secondes jusqu'à une valeur minimum. Cette première phase se traduit donc par un jet d'oxygène. La vitesse croît ensuite lentement en présentant une oscillation peu marquée. Elle atteint en 3 mn (dans les conditions expérimentales de la figure 2) une valeur maximum stationnaire. Cette description peut s'appliquer à tous les phénomènes d'induction étudiés; seuls les aspects quantitatifs subissent d'importantes variations.

3. Construction des diagrammes de vitesse (fig. 3).

Les diagrammes exprimant les vitesses des échanges d'oxygène en fonction du temps sont obtenus en différenciant les enregistrements des concentrations d'oxygène. Pour faciliter l'interprétation, on porte en ordonnée la différence algébrique entre la vitesse d'émission d'oxygène et la vitesse de respiration. La valeur de la respiration pouvant varier légèrement à la lumière, elle est déterminée,

à la suite d'un certain nombre d'expériences préliminaires, en interrompant la lumière après des périodes d'illumination de durée de plus en plus longue. Les valeurs intermédiaires de la vitesse de

période d'obscurité précédant l'illumination et de la température. Les effets de ces différents facteurs sur les principales phases de la période d'induction seront étudiés successivement.

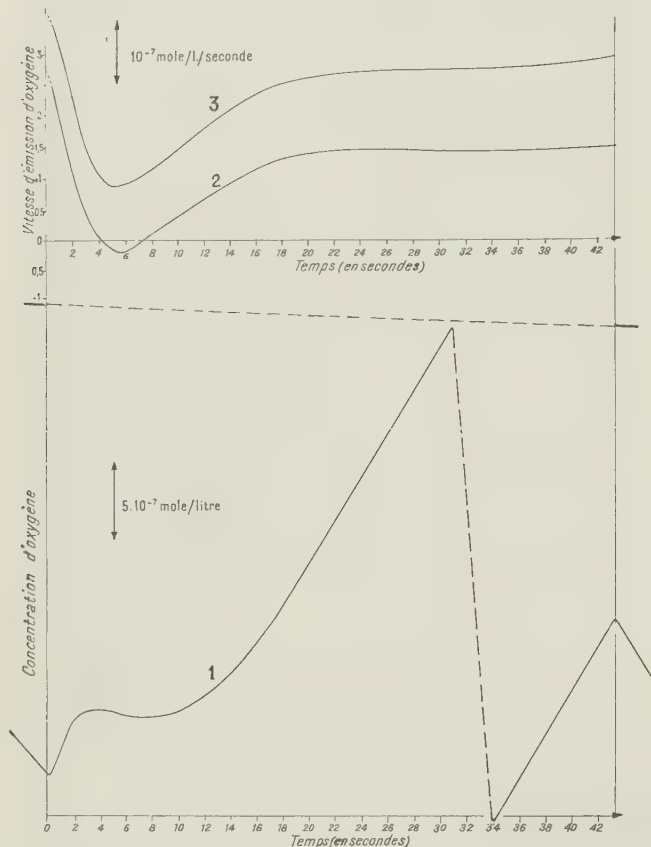


Fig. 3. — Différenciation graphique d'un enregistrement de concentration d'oxygène.

Concentration des algues: 2 UA/ml. Concentration de chlorophylle: 0,071 g/l. Temps de doublement: 8,1 h. Température: 12 °C.

Courbe 1: enregistrement de la concentration d'oxygène. Courbe 2: vitesse des échanges d'oxygène. Courbe 3: vitesse d'émission d'oxygène (corrigée de la valeur de la respiration indiquée par la ligne en tirets).

respiration sont déterminées par interpolation en supposant les variations linéaires. Les cinétiques obtenues dans la première demi-seconde qui suit l'établissement de la lumière ne seront pas représentées. Elles n'ont pas de signification, en raison de l'inertie du galvanomètre.

4. Résultats expérimentaux.

Les expériences correspondant aux figures 4, 5, 6, portent sur l'étude des cinétiques d'induction en fonction de l'intensité lumineuse, de la durée de la

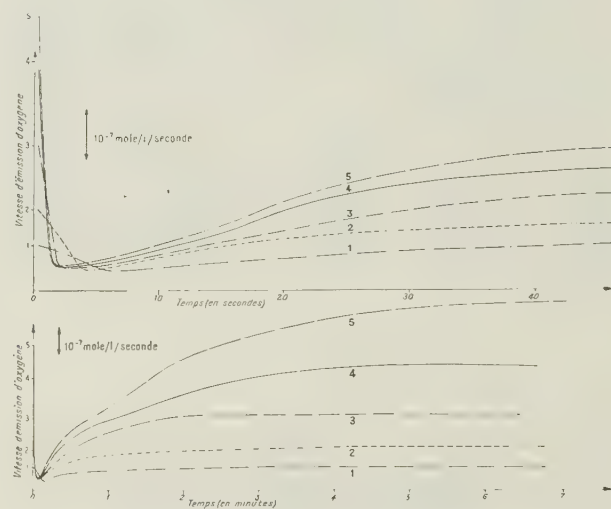


Fig. 4. — Effet de l'intensité lumineuse sur les cinétiques d'induction.

Concentration des algues: 2 UA/ml. Concentration de chlorophylle: 0,044 g/l. Temps de doublement: 9,2 h. Température: 8 °C.

Intensité lumineuse (unité arbitraire): Courbe 1: 1. Courbe 2: 1,85. Courbe 3: 3,5. Courbe 4: 7. Courbe 5: 15.

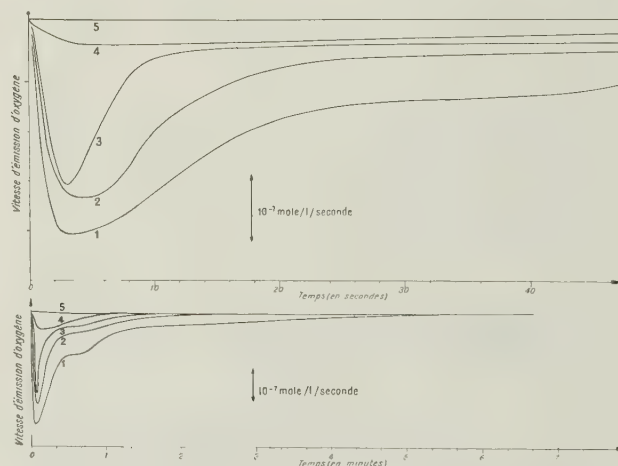


Fig. 5. — Effet de la durée de la période d'obscurité précédant l'illumination.

Concentration des algues: 2 UA/ml. Concentration de chlorophylle: 0,060 g/l. Température: 12 °C. Préillumination: 5 mn. avec même intensité lumineuse que pendant l'expérience. Période d'obscurité précédant l'illumination: courbe 1: plus de 1 h; courbe 2: 4 mn; courbe 3: 1,30 mn; courbe 4: 30 sec.; courbe 5: 5 sec.

a) *Vitesse initiale d'émission d'oxygène.* — Pour de faibles intensités lumineuses, la vitesse initiale est proportionnelle à l'intensité lumineuse et égale à la vitesse stationnaire (fig. 4, 5, 6). Aux fortes

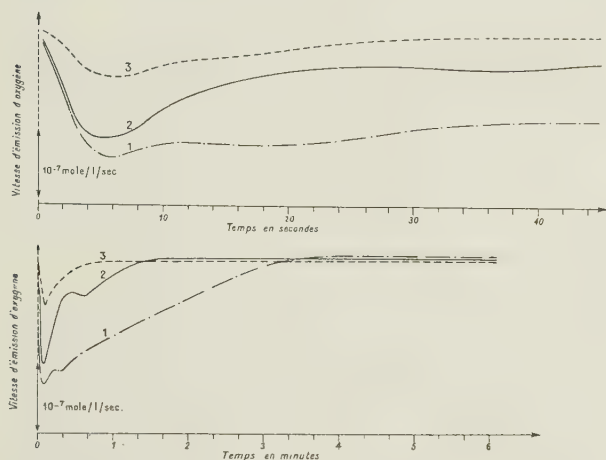


Fig. 6. — Effet de la température sur les cinétiques d'induction.

Concentration des algues : 2 UA/ml. Concentration de chlorophylle : 0,054 g/l. Temps de doublement : 8,7 h.

Température : courbe 1 : 3 °C. Courbe 2 : 13 °C. Courbe 3 : 23,5 °C.

intensités lumineuses, la durée de l'émission initiale d'oxygène est trop courte par rapport à la rapidité de réponse de l'appareil pour que des mesures de vitesse aient une signification.

La valeur de la vitesse initiale ne varie pas en fonction de la durée de la période d'obscurité précédant l'illumination (fig. 5).

L'égalité de la vitesse initiale et de la vitesse stationnaire a été vérifiée, quelle que soit la longueur d'onde de la lumière.

b) *Jet d'oxygène.* — Pendant le jet d'oxygène, la décroissance de la vitesse est d'autant plus rapide que l'intensité de la lumière est plus forte; elle est d'autant plus lente que la période d'obscurité précédant l'illumination est plus courte.

Le volume d'oxygène dégagé ne peut être calculé avec précision, la valeur du minimum de vitesse qui suit le jet d'oxygène n'étant jamais nulle. Cependant, en forte lumière, le jet d'oxygène est relativement bien isolé. Il correspond, dans le cas de la figure 4, à $3,8 \cdot 10^{-7}$ mole/litre, soit $1/500^e$ de la concentration de chlorophylle. Le volume d'oxygène dégagé est pratiquement indépendant de la température.

c) *Minimum de vitesse.* — La vitesse d'émission d'oxygène pendant le minimum qui suit le jet d'oxygène est limitée principalement par une réaction thermique. Cette vitesse est indépendante de l'intensité de la lumière dans un grand domaine d'intensités

(fig. 4). La valeur du minimum de vitesse croît quand la durée de la période d'obscurité précédant l'illumination diminue. Pour des périodes d'obscurité de quelques dizaines de seconde, le minimum disparaît totalement (fig. 5).

d) *Période de croissance de la vitesse d'émission d'oxygène.* — Après le jet initial, les vitesses d'émission d'oxygène varient beaucoup plus lentement. C'est cette phase qui a fait l'objet de la plupart des études classiques sur l'induction; les courbes obtenues aux différentes intensités lumineuses passent toutes par une vitesse minimum sensiblement identique, puis se séparent progressivement. La plupart des diagrammes montrent une oscillation de vitesse parfois très marquée qui apparaît 10 à 30 s après le début de l'illumination.

De ces premiers résultats, il ressort que les processus conduisant à l'émission d'oxygène au début de la période d'illumination d'une part, et quand la photosynthèse a atteint un régime stationnaire d'autre part, présentent un certain nombre de caractéristiques communes. Il semble logique de supposer que la réaction photochimique et les réactions thermiques qui conduisent à l'émission d'oxygène à partir des produits photochimiques primaires sont communes aux deux processus.

En conséquence, les enzymes catalysant la formation de l'oxygène ne seraient pas désactivées après une période d'obscurité comme le supposent certains auteurs [GAFFRON ⁽⁹⁾, FRANCK ⁽¹⁰⁾].

Les relations entre la photosynthèse et l'émission initiale d'oxygène seront précisées en étudiant les cinétiques transitoires provoquées par des variations d'éclairement intervenant pendant la période d'induction.

III. — Variations de l'éclairement pendant la période d'induction.

1. Interruption de l'éclairement (fig. 7).

a) Les enregistrements de concentration d'oxygène de la figure 7 montrent que l'émission d'oxygène cesse presque instantanément après l'interruption de l'illumination.

La vitesse de l'absorption d'oxygène est nettement plus rapide immédiatement après l'interruption de l'illumination. La durée de vie de cette « extraoxydation » est de l'ordre de 2 à 4 s. Sa valeur croît avec l'intensité de la lumière. L'importance de ce phénomène est extrêmement variable suivant les conditions de culture des algues. Pour des algues cultivées à de fortes intensités lumineuses, l'extraoxydation est très faible.

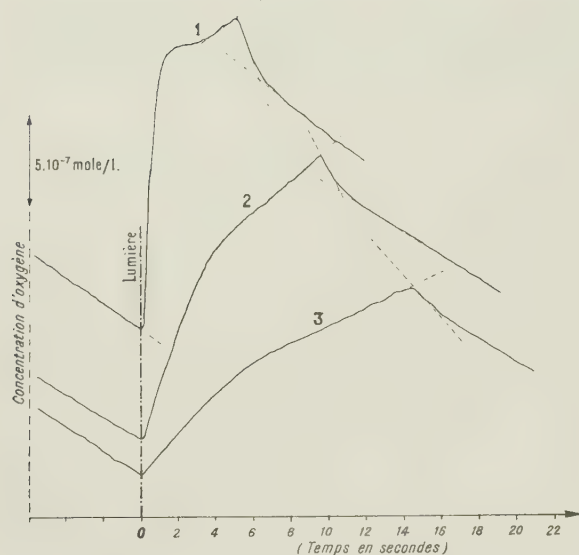


Fig. 7. — Interruption de l'éclairement pendant la période d'induction.

Concentration des algues : 4 UA/ml. Concentration de chlorophylle : 0,19 g/l. Temps de doublement : 10 h. Température : 3 °C.

Intensité lumineuse (valeur relative): courbe 1: 10; courbe 2: 1,95; courbe 3: 1.

b) Les variations de l'extraoxydation ont été suivies en fonction de la durée de la période d'illumination (fig. 8). L'extraoxydation s'établit pendant

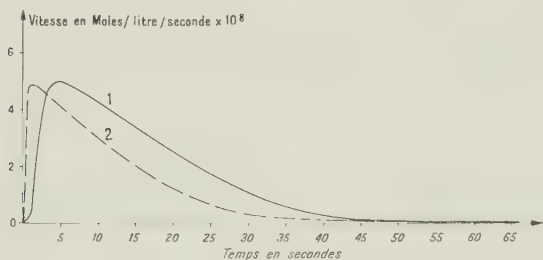


Fig. 8. — Valeur de l'extraoxydation en fonction de la durée de la période d'illumination.

La lumière est interrompue après une période d'illumination dont la durée est portée en abscisses.

Vitesse d'extraoxydation = vitesse d'absorption d'oxygène mesurée immédiatement après l'interruption de la lumière moins vitesse stationnaire de la respiration.

1 faible intensité lumineuse.

2 forte intensité lumineuse.

la période d'émission initiale d'oxygène, puis décroît rapidement au cours de l'induction. Elle est pratiquement négligeable après 1 mn d'illumination, aussi bien en forte qu'en faible lumière. Si l'on admet, comme dans la section précédente, que la vitesse d'oxydation ne subit pas de discontinuité au moment de l'interruption de la lumière, la vitesse photo-

chimique d'émission d'oxygène doit être calculée en tenant compte de la vitesse d'absorption de l'oxygène immédiatement après l'interruption de l'illumination, ce qui peut modifier considérablement l'aspect des cinétiques d'induction.

Dans le cas des expériences décrites dans le paragraphe précédent, les algues présentaient une extraoxydation très faible (culture en forte lumière), les corrections à apporter aux cinétiques des figures 4, 5, 6 sont donc négligeables.

L'extraoxydation ne peut en aucun cas être rapprochée du phénomène observé par WARBURG, étant donné d'une part sa durée de vie très faible et d'autre part sa disparition totale après 1 à 2 mn d'illumination.

Il faut insister sur le fait que, tout au moins en faible lumière, la vitesse des échanges d'oxygène subit une variation pratiquement discontinue au moment de l'interruption de la lumière. Si les réactions thermiques conduisant à l'émission d'oxygène étaient limitantes, il s'accumulerait un composé intermédiaire qui permettrait à l'émission d'oxygène de se poursuivre un certain temps à l'obscurité. L'absence d'une telle production d'oxygène ne s'expliquerait alors que par l'existence d'une réaction inverse détruisant rapidement cet intermédiaire. L'étude de l'effet d'une courte interruption de l'illumination permet d'éliminer cette hypothèse.

2. Effets de courtes périodes d'obscurité pendant l'induction (fig. 9).

Au moment du rétablissement de l'illumination, la vitesse d'émission d'oxygène est nettement plus forte qu'avant l'interruption de la lumière. On observe un nouveau jet d'oxygène analogue au jet initial mais de plus faible importance. Pour la période d'obscurité la plus courte (1 s), la courbe rejoint pratiquement celle qui est obtenue en lumière continue (courbe 1). La réaction thermique limitant la vitesse de photosynthèse a donc pu se poursuivre à l'obscurité. Sa vitesse décroît au cours de la période d'obscurité mais, pour une courte interruption d'éclairement, on peut la considérer comme constante et égale à sa valeur à la lumière. Ces expériences s'interprètent si l'on admet qu'il existe un complexe susceptible de se décomposer photochimiquement en émettant de l'oxygène. C'est la vitesse de formation de ce complexe qui limiterait l'émission d'oxygène pendant la période d'induction.

3. Augmentation de l'intensité lumineuse pendant la période d'induction (fig. 10).

Les algues sont tout d'abord illuminées en faible lumière pendant une période de durée variable. Au

temps zéro, l'intensité lumineuse est multipliée par dix; après quelques secondes, elle est ramenée à sa valeur initiale. On observe tout d'abord un nouveau jet d'oxygène, puis la vitesse regagne approximativement la valeur mesurée avant l'augmentation

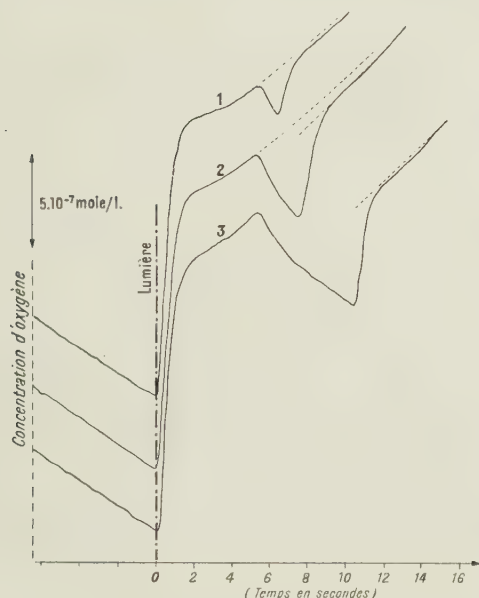


Fig. 9. — Effet de courtes interruptions de l'éclairement pendant la période d'induction.

Concentration des algues : 4 UA/ml. Concentration de chlorophylle : 0,19 g/l. Temps de doublement : 10 h. Température : 3 °C.

Forte lumière. Durée de la période d'obscurité : courbe 1 : 1 sec.; courbe 2 : 2 sec.; courbe 3 : 5 sec.

d'intensité. Lors de la diminution d'éclairement, le phénomène inverse se produit. Si la durée de la période de forte intensité est suffisamment courte, le bilan total de l'opération est nul, exactement comme à la suite d'une courte période d'obscurité. En raison de la rapidité de la cinétique transitoire, il n'est pas possible de mesurer avec précision les vitesses instantanées.

Le volume d'oxygène dégagé est d'autant plus important que la vitesse de photosynthèse au moment de l'augmentation d'intensité est plus forte. Si l'augmentation d'intensité a lieu quand la vitesse est devenue stationnaire (courbe 4), on observe un jet d'oxygène dont le volume est difficile à apprécier, le minimum qui le suit étant peu marqué. Ces expériences confirment l'existence d'un complexe libérant photochimiquement de l'oxygène et dont la vitesse de formation est égale à la vitesse de destruction. Une variation de l'intensité lumineuse provoque une cinétique transitoire parfaitement observable, qui conduit à un nouvel état stationnaire.

Le fait que la substance responsable du jet d'oxygène, détruite au début de l'illumination, se reforme



Fig. 10. — Effet d'une augmentation de l'intensité lumineuse pendant la période d'induction.

Concentration des algues : 4 UA/ml. Concentration de chlorophylle : 0,176 g/l. Temps de doublement : 8,6 h. Température : 5 °C.

Durée de la période d'illumination avant l'augmentation de l'intensité lumineuse : courbe 1 : 5 sec.; courbe 2 : 10 sec.; courbe 3 : 42 sec.; courbe 4 : 7 mn.

Au temps zéro l'intensité lumineuse est multipliée par 10; l'intensité lumineuse est ensuite ramenée à sa valeur initiale (ψ).

Le zéro de concentration d'oxygène est différent pour les quatre courbes. Le début de la période d'illumination, visible sur les courbes 1 et 2 est en dehors du dessin pour les courbes 3 et 4.

pendant la période d'induction, prouve bien que ce complexe est directement impliqué dans le mécanisme de production d'oxygène de la photosynthèse.

IV. — Influence des conditions de culture.

Les moyens de faire varier les caractéristiques physiologiques d'une culture d'algues sont multiples. Sans parler des possibilités de sélection génétique de souches d'algues, il suffit de faire varier les conditions de culture pour obtenir des modifications considérables de la physiologie de la plante. Les principales données métrologiques utilisées pour caractériser une culture d'algues sont : le poids sec, le volume, la concentration de chlorophylle, la vitesse

de croissance, l'absorption apparente, etc. Pour faire varier ces données, il suffit de modifier soit les conditions physiques de la culture (éclairage, température) soit les conditions chimiques (milieu). De plus, une culture n'est jamais à l'abri de variations dont l'origine est souvent difficile à interpréter.

L'étude de la cinétique des échanges gazeux en fonction des conditions de culture est un sujet très vaste et n'a pu être abordée systématiquement dans ce travail. Cependant les résultats d'un grand nombre d'expériences effectuées sur des algues cultivées dans diverses conditions font apparaître une opposition frappante entre la reproductibilité des principaux aspects des phénomènes d'induction et la variabilité de certaines données quantitatives. Parmi ces dernières, il faut citer en particulier la vitesse de respiration (beaucoup plus grande pour des algues cultivées en forte lumière), la valeur de la vitesse de l'extraoxydation, le volume du jet initial d'oxygène (plus grand pour des algues cultivées en faible

lumière), la deuxième vague d'induction parfois à peine discernable, et la durée totale de la période d'induction pour une lumière donnée. La figure 11 donne un exemple de l'importance des variations quantitatives qui s'observent suivant les conditions dans lesquelles les algues ont été cultivées (voir tableau).

V. — Influence de quelques facteurs sur les cinétiques d'induction.

1. Concentration d'oxygène.

Il faut distinguer les effets de l'anaérobiose des effets qui s'observent pour des concentrations d'oxygène déjà notables.

a) Toutes les expériences décrites précédemment sont effectuées à des concentrations d'oxygène relativement basses. Les mêmes expériences effectuées à de plus fortes concentrations d'oxygène ne montrent pas de différences essentielles. Cependant la vitesse d'extraoxydation de certaines catégories d'algues est fortement augmentée, ce qui se traduit sur les diagrammes par une diminution de la valeur apparente du minimum de vitesse qui suit le jet initial (fig. 12).

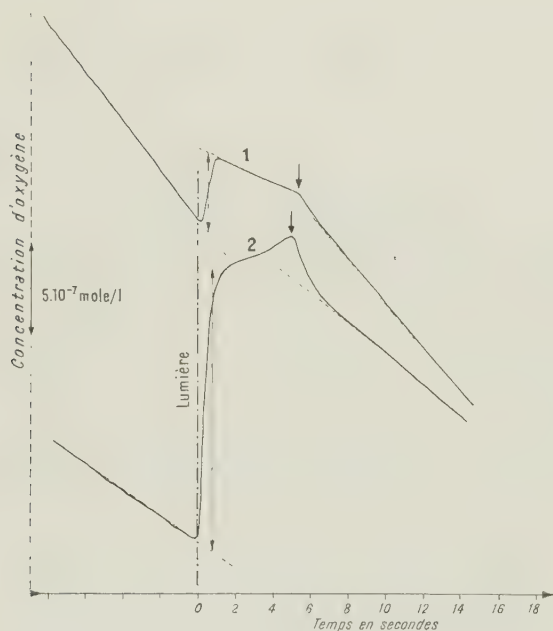


Fig. 11. — Influence des conditions de culture sur les cinétiques d'induction.

Concentration des algues: 4 UA/ml. Température: 3 °C. Forte lumière. (ψ) Obscurité.

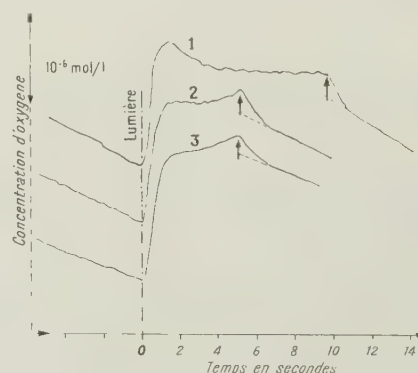


Fig. 12. — Influence de la concentration d'oxygène sur les cinétiques d'induction.

Concentration des algues: 4 UA/ml. Température: 4 °C. Forte lumière.

Concentration d'oxygène: courbe 1: $14,5 \cdot 10^{-5}$ mole/l; courbe 2: $2,7 \cdot 10^{-5}$ mole/l; courbe 3: $0,6 \cdot 10^{-5}$ mole/l; (ψ): Obscurité.

	Algues (1)	Algues (2)
Intensité de la lumière pendant la culture	1	0,5
Temps de doublement (heures).....	8	10
Concentration de chlorophylle (g/l)...	0,19	0,20
Volume du jet d'oxygène ($\times 10^7$ mole/litre)	4,4	15,5
Vitesse de la respiration ($\times 10^7$ mole/litre/sec.)	1,55	0,73
Vitesse de l'extraoxydation ($\times 10^7$ mole/litre/sec.)	0,30	3,3

b) Anaérobiose. L'anaérobiose est obtenue en épuisant l'oxygène par la respiration des algues. A la lumière, on s'écarte rapidement des conditions d'anaérobiose par suite de la production photosynthétique d'oxygène. Il est cependant possible de tirer quelques conclusions qualitatives.

— *Courtes périodes d'anaérobiose* (inférieures à 2 mn): le jet d'oxygène n'est pratiquement pas modifié. Après cette phase initiale, la vitesse d'émis-

sion d'oxygène est extrêmement faible. Elle n'est cependant jamais tout à fait nulle.

— *Longues périodes d'anaérobiose* : Pour des durées croissantes de la période d'anaérobiose, il se développe progressivement une inhibition du jet d'oxygène, qui touche la vitesse initiale et le volume total d'oxygène dégagé.

2. Concentration de gaz carbonique.

a) Fortes concentrations (fig. 13). Pour des concentrations de gaz carbonique supérieures à 10 %

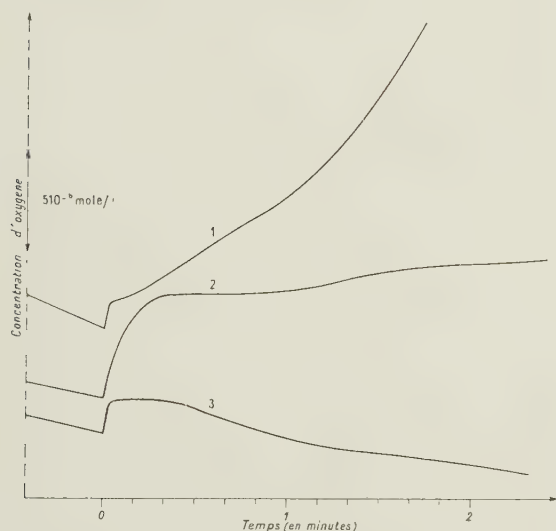


Fig. 13. — Effet de fortes concentrations de gaz carbonique sur les cinétiques d'induction en forte lumière.

Concentration des algues : 4 UA/ml. Temps de doublement 10,6 h. Température : 5 °C.

Courbe 1 : concentration de gaz carbonique = 2 % d'une solution d'air saturée. Courbe 2 : concentration de gaz carbonique = 50 % ; algues préilluminées 8 mn ; période d'obscurité précédant l'illumination : 30 sec. Courbe 3 : concentration de gaz carbonique = 50 % ; période d'obscurité précédant l'illumination supérieure à 1 h.

Le volume d'oxygène dégagé pendant le jet d'oxygène après une préillumination est environ 3 fois plus grand que pour des algues non préilluminées.

d'une solution saturée, il apparaît une inhibition de la photosynthèse. Cette inhibition est négligeable pendant le jet d'oxygène. Après celui-ci, la vitesse d'émission d'oxygène passe par une valeur pratiquement nulle puis augmente très lentement. En très faible lumière, la vitesse stationnaire atteint une valeur identique à celle qui est mesurée en l'absence d'inhibition, mais la durée de la période d'induction peut être 5 à 10 fois plus longue. Notons que cette méthode peut être utilisée pour isoler le jet d'oxygène, et pour mesurer avec précision le volume d'oxygène dégagé correspondant. Les courbes 2 et 3 de la figure 13 montrent que, pour des algues préillu-

minées, le jet d'oxygène est beaucoup plus important qu'après une longue période d'obscurité. Il s'accumule donc à la lumière une substance qui doit permettre la régénération du complexe photochimique.

b) Faibles concentrations de gaz carbonique. Il est possible d'étudier la vitesse d'émission d'oxygène au point de compensation obtenu quand on épuise complètement la réserve de gaz carbonique. Il s'établit un équilibre entre la vitesse d'absorption et la vitesse de production du gaz carbonique. Les expériences de la figure 14 mettent en évidence deux faits intéressants :

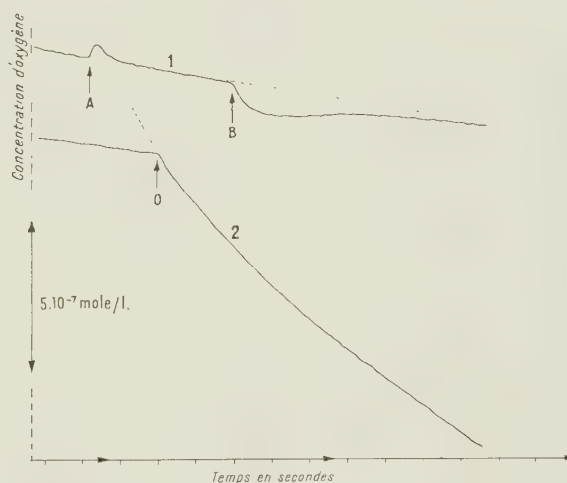


Fig. 14. — Photosynthèse aux faibles concentrations de gaz carbonique.

Concentration des algues : 2 UA/ml. Température : 6 °C. Lumière limitante.

Courbe 1 : en (A), l'intensité de la lumière est multipliée par 10. En (B), elle est ramenée à sa valeur initiale. Courbe 2 : (0) obscurité.

Au point de compensation du gaz carbonique, on observe une légère diminution de la concentration d'oxygène due à la consommation électrochimique.

1° La vitesse de respiration mesurée au point de compensation est nettement plus forte que la vitesse de respiration normale (courbe 2). Cet accroissement ne semble pas avoir la même origine que l'extraoxydation, la durée de vie de ces phénomènes étant très différente. Cette augmentation de la vitesse de respiration est d'autant plus grande que l'intensité de la lumière est plus forte. Les mesures de vitesses d'émission d'oxygène aux basses concentrations de gaz carbonique effectuées à l'aide de méthodes de dosage présentant une grande inertie sont donc entachées d'une erreur importante. La vitesse d'émission d'oxygène au point de compensation, calculée en tenant compte de la valeur stationnaire de la vitesse de respiration (fig. 14, courbe 2), est égale à $0,35 \cdot 10^{-7}$ mole/l/s, alors que sa valeur réelle est de $0,96 \cdot 10^{-7}$ mole/l/s. Cette dernière vitesse est très

peu différente de la vitesse stationnaire maximum obtenue à plus fortes concentrations de gaz carbonique (2 %), soit $1,01 \cdot 10^{-7}$ mole/l/s. Dans ces conditions, la vitesse d'émission d'oxygène n'a donc pratiquement pas varié, seule la vitesse de respiration a fortement augmenté.

2° Des modifications d'intensité lumineuse effectuées au point de compensation ont pour effet de faire varier instantanément la vitesse d'émission d'oxygène, exactement comme pendant la période d'induction (courbe 1).

3. Hydroxylamine.

On sait que l'hydroxylamine inhibe la photosynthèse stationnaire en faible lumière et en forte lumière dans une même proportion. La figure 15 montre que le pourcentage d'inhibition est constant pendant la période d'induction, sauf au minimum de vitesse où l'inhibition atteint presque 100 %. L'hydroxylamine diminue également le volume d'oxygène produit pendant le jet.

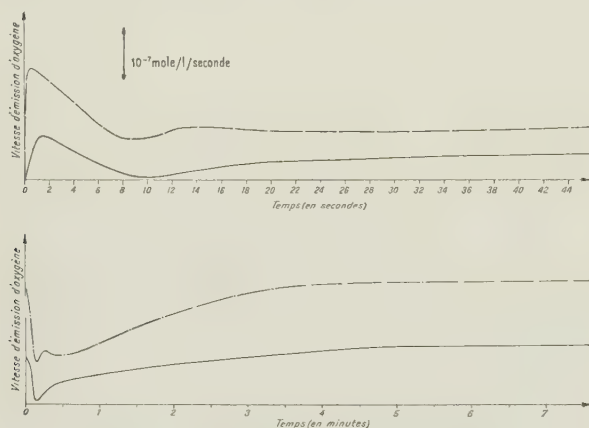


Fig. 15. — Effet de l'hydroxylamine sur la période d'induction en faible lumière.

Concentration des algues: 4 UA/ml. Concentration de chlorophylle: 0,19 g/l. Temps de doublement: 10,1 h. Température: 4 °C.

Trait interrompu: algues non inhibées. Trait continu: algues inhibées par l'hydroxylamine (concentration: $7 \cdot 10^{-4}$ mole/l).

4. Cyanure.

L'étude de l'effet du cyanure de potassium doit s'effectuer dans une cellule spéciale, l'électrode d'argent libérant des complexes solubles. L'électrode de référence est constituée par une électrode au calomel reliée à la cuve électrochimique par un pont d'agar; ce dispositif n'est utilisable qu'aux faibles concentrations d'oxygène (résistance excessive du pont d'agar).

L'inhibition par le cyanure est nulle pendant le jet d'oxygène. Elle se développe progressivement en forte lumière pendant la période d'induction (fig. 16).

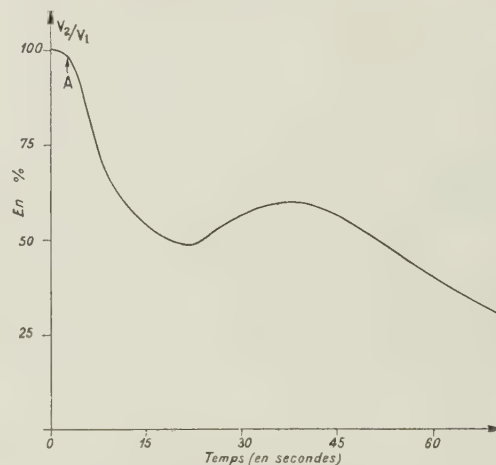


Fig. 16. — Effet du cyanure sur les cinétiques d'induction en forte lumière.

Concentration des algues: 2 UA/ml. Température: 22 °C.
 V_1 vitesse d'émission d'oxygène en l'absence de cyanure.
 V_2 Vitesse d'émission d'oxygène en présence de cyanure (10^{-3} mole/l).

A correspond au minimum de vitesse qui suit le jet initial.

5. Phényluréthane.

Le pourcentage d'inhibition de la vitesse d'émission d'oxygène en faible lumière est approximativement le même au début de la période d'illumination et en régime stationnaire. Le volume d'oxygène dégagé pendant le jet n'est pas modifié.

TABLEAU RÉCAPITULATIF DE L'EFFET DES INHIBITEURS

+ = inhibition.
 — = pas d'effet d'inhibition.

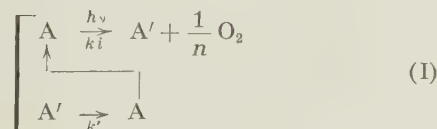
	Vitesse stationnaire Forte intensité	Vitesse stationnaire Faible intensité	Durée de l'induction	jet d'oxygène	Vitesse initiale
Anaérobiose (courte période)	?	?	+	—	—
Anaérobiose (longue période)	?	?	+	+	+
CO ₂ (forte concentration)	+	—	+	—	—
CNK	+	—	—	—	—
Hydroxylamine	+	+	—	+	+
Phényluréthane	+	+	—	—	+

VI. — Interprétation.

1. Représentation analytique.

Au cours de cet exposé, une interprétation des principaux résultats expérimentaux a déjà été esquissée. Cette interprétation repose essentiellement sur le fait que, en faible lumière, une variation d'éclairement se traduit toujours par une modification presque instantanée de la vitesse d'émission d'oxygène. J'ai donc été conduit à admettre qu'il existe un complexe qui se décompose photochimiquement en donnant naissance à l'oxygène. La formation de ce complexe serait la réaction limitante pendant la période d'induction. En fait, il est peu probable que la réaction photochimique donne directement naissance à de l'oxygène libre, mais tout au moins en faible lumière, les constantes de vitesse de réactions intermédiaires doivent être suffisamment grandes pour ne pas limiter la vitesse de production d'oxygène.

Les cinétiques transitoires qui apparaissent à la suite des modifications d'intensité étant facilement mesurables, il faut admettre que les concentrations du complexe photochimique ont une valeur relativement importante. L'hypothèse la plus simple consiste à admettre que la concentration molaire maximum du complexe est mesurée par le nombre de molécules d'oxygène dégagées pendant le jet initial. Cette quantité, variable suivant l'état physiologique des algues, est comprise entre 1/500^e et 1/150^e de la concentration molaire de chlorophylle. Il faut remarquer que, si l'on suppose que la réaction photochimique primaire nécessite l'absorption d'un seul quantum, on doit, pour obtenir la concentration réelle du complexe photochimique, multiplier le nombre de molécules d'oxygène produites pendant le jet d'oxygène par le nombre n de quanta nécessaires à la production d'une molécule d'oxygène. L'hypothèse proposée peut se représenter schématiquement par les réactions :



Si x est la concentration de A et a la concentration maximum de A, les équations différentielles des réactions (I) sont :

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dx}{dt} = -k_i x + k'(a - x) \\ \frac{d(O_2)}{dt} = k_i x \end{array} \right. \quad (1)$$

En fait, k' n'est pas une constante mais augmente progressivement pendant la période d'induction et diminue à l'obscurité. Au cours de la période d'induction en faible lumière, la valeur de k' devient suffisante pour que la concentration d'équilibre de A, et par suite la vitesse d'émission d'oxygène, atteignent toutes deux une valeur maximum. En raison du phénomène d'extraoxydation et du fait que k' n'est pas une constante, il n'est pas possible d'établir une représentation analytique des cinétiques d'induction à partir du système d'équations différentielles (1). Cependant, on peut montrer, d'une manière qualitative, que l'essentiel des résultats expérimentaux qui ont été décrits sont traduits d'une manière satisfaisante par cette hypothèse.

Les courbes de la figure 17 obtenues à partir des équations (1) en supposant k' constant, montrent

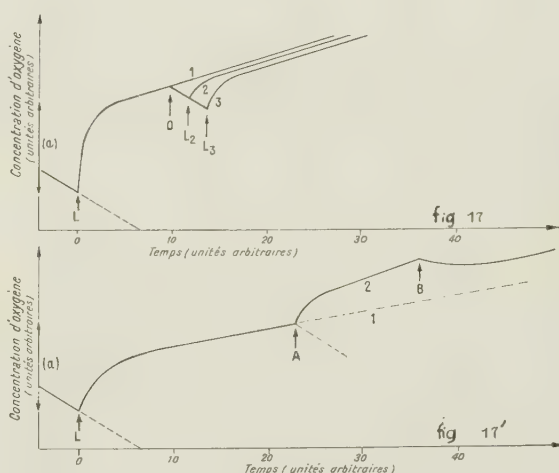


Fig. 17 et 17'. — Courbes théoriques obtenues à partir des équations différentielles (1).

Fig. 17. — Effet d'une courte période d'obscurité sur les cinétiques d'induction. $k' = 1$, $k_i = 15$. L : lumière. Courbe 1 : pas d'interruption de la lumière. Courbe 2 : la lumière est interrompue en 0 et rétablie en L₂. Courbe 3 : la lumière est interrompue en 0 et rétablie en L₃.

a = volume total du jet d'oxygène en forte lumière.

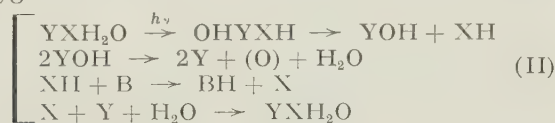
Fig. 17'. — Effet d'une augmentation de l'intensité lumineuse pendant la période d'induction. $k' = 1$, $k_i = 3$. L : lumière. En A, l'intensité de la lumière est multipliée par 10 ($k_i = 30$); en B, l'intensité est ramenée à la valeur initiale.

l'effet de variations d'éclairement sur les cinétiques d'induction. L'analogie avec les courbes expérimentales des figures 9 et 10 est très frappante. Toutefois, une analyse plus précise des cinétiques expérimentales laisse prévoir qu'il sera nécessaire de recourir à une théorie plus complexe.

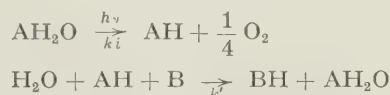
2. Interprétation.

Après avoir donné une représentation formelle des cinétiques d'induction, il est nécessaire d'essayer de

rattacher cette interprétation aux hypothèses qui ont été mises en avant pour expliquer l'essentiel du processus photosynthétique. Un certain nombre d'auteurs ont supposé que la réaction photochimique primaire correspondait à la photolyse de l'eau [THUNBERG et WEIGERT ⁽¹¹⁾, WURMSER ⁽¹²⁾]. En partant de cette conception, de nombreux schémas ont été proposés pour représenter les réactions fondamentales de la photosynthèse. Les plus simples de ces schémas sont ceux dans lesquels on suppose que 4 quanta suffisent pour produire une molécule d'oxygène.



En faible lumière, les constantes de vitesse des réactions intervenant entre la réaction photochimique et l'émission d'oxygène étant grandes par rapport à la constante photochimique, il est possible de représenter les équations (II) sous une forme simplifiée, mais équivalente du point de vue cinétique :



Dans cette interprétation, la réaction limitante serait donc la formation de l'accepteur d'hydrogène B, ce qui semble logique étant donné que les accepteurs d'hydrogène photosynthétiques n'existent qu'à faible concentration après une longue période d'obscurité. Il faut cependant remarquer que rien ne permet de supposer que cette concentration est nulle. Dans le cas où il existerait une certaine réserve d'accepteurs d'hydrogène, le volume d'oxygène produit au début de l'illumination correspondrait à la somme des concentrations du complexe photochimique et de cette réserve d'accepteurs d'hydrogène B.

La présence, après une longue période d'obscurité, d'une certaine quantité d'accepteurs d'hydrogène permet d'expliquer certaines divergences entre les cinétiques expérimentales et la représentation analytique qui a été donnée plus haut, en particulier le fait que la vitesse d'émission d'oxygène ne décroît pas toujours d'une manière exponentielle pendant le jet initial.

Il est maintenant nécessaire de confronter ces hypothèses avec l'ensemble des faits expérimentaux décrits ici, et avec les interprétations classiques des phénomènes de la photosynthèse.

a) Cycle de fixation du carbone.

CALVIN et ses collaborateurs ⁽¹³⁾ ont pu mettre en évidence l'existence d'un cycle autocatalytique

de fixation du gaz carbonique et de formation de l'accepteur d'hydrogène. L'hydrogène d'origine photosynthétique serait fixé sur un corps analogue à l'acide phosphoglycérique. Le triacool formé conduirait à des sucres en C₇ puis en C₅ qui fixeraient le gaz carbonique et donneraient naissance à deux nouvelles molécules d'acide phosphoglycérique. L'existence d'un tel cycle s'accorde très bien avec l'interprétation proposée des cinétiques d'induction et permet en outre d'expliquer certains faits expérimentaux.

La présence d'une réserve importante d'accepteurs d'hydrogène après une période d'illumination a été prouvée par différents auteurs ⁽¹⁴⁾ et en particulier par CALVIN. L'étude de l'induction en présence de fortes concentrations de gaz carbonique qui semblent bloquer le cycle de CALVIN, permet de mettre en évidence ce phénomène. En effet, la comparaison des cinétiques d'induction obtenues avec ou sans préillumination (fig. 13) montre qu'il s'est accumulé à la lumière une substance permettant un dégagement d'une quantité importante d'oxygène.

La seconde vague d'induction peut s'interpréter si l'on admet que le cycle de CALVIN est amorcé brutalement pendant la durée du jet d'oxygène, ce qui provoquerait, quand le cycle se refermerait, une nouvelle oscillation de vitesse, plus ou moins amortie.

b) Extraoxydation.

Ce phénomène apparaissant quand l'accepteur d'hydrogène est en quantité insuffisante, il peut correspondre à l'utilisation de l'oxygène, d'une manière plus ou moins directe, comme accepteur d'hydrogène de remplacement; la quantité d'oxygène consommée serait égale à la quantité d'oxygène produite en excès par la réaction photochimique. Le bilan serait donc nul. Au moment de l'interruption de l'illumination, cette extraoxydation disparaîtrait vite, le réducteur produit par la réaction photochimique s'épuisant rapidement.

Un phénomène du même ordre a été étudié par MEHLER ⁽¹⁵⁾, qui a pu observer que la réaction de HILL ⁽¹⁶⁾ pouvait dans certains cas admettre l'oxygène comme oxydant de HILL.

c) Action des inhibiteurs.

Il faut tout d'abord remarquer, que si certains inhibiteurs diminuent la vitesse stationnaire de la photosynthèse sans modifier le jet initial d'oxygène, on n'observe jamais une inhibition de ce dernier sans altération de la photosynthèse stationnaire. C'est un nouvel argument en faveur des hypothèses dans lesquelles on suppose que les réactions mises en jeu pendant le jet d'oxygène représentent un élément de la chaîne des réactions impliquées dans le processus photosynthétique.

Cas du cyanure: Dans l'interprétation classique de l'inhibition de la photosynthèse par le cyanure, on suppose que celui-ci agit principalement sur les systèmes enzymatiques responsables de la fixation du gaz carbonique, et non sur la réaction photochimique ou sur les réactions conduisant à l'émission d'oxygène.

Cette interprétation est en accord avec les résultats expérimentaux décrits dans la figure 16, qui montrent que le cyanure est sans effet sur la phase initiale de l'émission d'oxygène.

Conclusions.

Grâce à une méthode de dosage de l'oxygène présentant une très faible inertie, il a été possible de mettre en évidence chez *Chlorella* une brusque émission d'oxygène qui intervient pendant les premières secondes de la période d'illumination et qui a été décrite par BLINKS et SKOW sur d'autres matériels biologiques.

La vitesse de cette émission d'oxygène est maximum au début de l'illumination et, pour de faibles intensités lumineuses, égale à la vitesse stationnaire de la photosynthèse.

Le volume d'oxygène dégagé est pratiquement indépendant de la température. Une variation d'intensité lumineuse intervenant pendant la période d'induction provoque toujours une variation simultanée de la vitesse d'émission d'oxygène. On observe une phase transitoire puis la vitesse regagne approximativement la valeur mesurée avant la variation d'intensité lumineuse.

Ces expériences s'interprètent en admettant l'existence d'un complexe qui libère plus ou moins directement de l'oxygène à la lumière. Après une période d'obscurité, ce complexe est présent à une concentration maximum. Au début de la période d'illumination, la vitesse de régénération de ce complexe est suffisamment faible pour que la quantité d'oxygène dégagée pendant la phase initiale mesure pratiquement la quantité du complexe photochimique.

Pendant toute la période d'induction, la vitesse d'émission d'oxygène est limitée par la vitesse de régénération du complexe photochimique et non pas comme le supposent FRANCK et GAFFRON par la

vitesse des réactions thermiques conduisant à l'émission d'oxygène.

En faible lumière, la vitesse de régénération du complexe devient suffisante pour que la concentration de celui-ci, et par suite la vitesse d'émission d'oxygène, regagnent une valeur maximum égale à la valeur initiale.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) P. JOLIOT. — *C. R. Acad. Sci.*, 1956, **243**, 677.
- (2) P. JOLIOT. — *Thèse de Doctorat ès sciences*, Paris, 1960.
- (3) P. JOLIOT. — *C. R. Acad. Sci.*, 1957, **244**, 2736.
- (4) D. BURK et O. WARBURG. — *Naturwissenschaften*, 1950, **37**, 560.
- (5) R. W. van NORMAN et A. H. BROWN. — *Plant Physiol.*, 1952, **27**, 691.
- (6) F. S. BRACKETT, R. A. OLSON et R. G. CRICKARD. — *J. gen. Physiol.*, 1953, **36**, 529.
- (7) B. KOK. — *Biochim. biophys. Acta*, 1949, **3**, 625.
- (8) L. R. BLINKS et R. K. SKOW. — *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Washington, 1938, **24**, 420.
- (9) H. GAFFRON. — *Naturwissenschaften*, 1937, **25**, 460; *Biol. Zentr.*, 1939, **59**, 288; *Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1939, **7**, 377; *Am. J. Botany*, 1940, **27**, 204.
- (10) J. FRANCK et C. S. FRENCH. — *J. Gen. Physiol.*, 1941, **25**, 309.
J. FRANCK, C. S. FRENCH et T. T. RUCK. — *J. phys. Chem.*, 1941, **45**, 1268.
J. FRANCK et H. GAFFRON. — *Adv. in Enzymol.*, 1941, **1**, 199.
J. FRANCK, P. PRINGSHEIM et D. T. LAD. — *Arch. Biochem.*, 1945, **7**, 103.
Y. G. SHIAU et J. FRANCK. — *Arch. Biochem.*, 1947, **14**, 253.
- (11) T. THUNBERG. — *Z. Phys. Chem.*, 1923, **106**, 305.
F. WEIGERT. — *Ibid.*, 1923, **106**, 313.
- (12) R. WURMSER. — *Oxydations et Réductions*, Presses Univ. France, Paris, 1930, p. 48.
- (13) J. A. BASSHAM et M. CALVIN. — *The Path of Carbone in Photosynthesis*. Prentice-Hall Inc. (U.S.A.), 1957.
- (14) H. TAMIYA, S. MIYACHI et T. HITOKAWA. — *Res. in Photosynthesis*, Interscience, 1957, p. 213.
- (15) A. H. MEHLER. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1951, **33**, 65 et **34**, 339.
- (15) A. H. MEHLER. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1952, **38**, 365.
A. H. MEHLER et A. H. BROWN. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1952, **38**, 365.
- (16) R. HILL. — *Proc. Roy. Soc. London*, 1939, **B 127**, 192.
R. HILL et R. SCARISBRICK. — *Nature*, 1940, **146**, 61; *Proc. Roy. Soc., London*, 1940, **B 129**, 238.

CHAPITRE III

CINÉTIQUE D'INDUCTION DE LA PHOTOSYNTHÈSE CHEZ CHLORELLA PYRENOIDOSA.

II. — Cinétique d'émission d'oxygène et fluorescence pendant la phase initiale d'illumination.

SOMMAIRE

I. La cinétique de l'émission d'oxygène qui s'observe au début de la période d'illumination a été étudiée à l'aide d'une méthode qui élimine les retards dus à l'inertie de la technique de dosage. Ces expériences ont montré l'existence d'une réaction d'activation photochimique de très courte durée qui s'observe pendant les premiers instants de la période d'illumination.

La sensibilité de la méthode de dosage a permis de mesurer la quantité d'oxygène produite à la suite d'éclairs électroniques de très courte durée. Les résultats obtenus confirment les mesures effectuées par EMERSON dans des conditions expérimentales très différentes.

Une interprétation, satisfaisante du point de vue analytique, a été donnée de l'ensemble de ces phénomènes; on suppose que le système enzymatique qui limite la quantité d'oxygène produite à la suite d'un éclair électronique est identique à celui intervenant dans la réaction d'activation photochimique.

L'interprétation simultanée des cinétiques d'induction décrites dans un article précédent et des phénomènes d'activation pose des problèmes complexes qui sont exposés à la fin de ce travail.

II. — La vitesse d'émission d'oxygène et l'intensité de la fluorescence de la chlorophylle ont été mesurées simultanément pendant la période d'induction de la photosynthèse. Les cinétiques obtenues montrent que ces deux grandeurs varient parallèlement pendant la phase initiale d'activation et d'une manière complémentaire pendant la période d'induction proprement dite. Ces résultats s'interprètent en supposant qu'il existe des transferts d'énergie entre la chlorophylle et les centres photochimiques découverts par EMERSON.

PREMIÈRE PARTIE

ÉTUDE DE LA CINÉTIQUE DE L'ÉMISSION D'OXYGÈNE PENDANT LA PHASE INITIALE DE LA PÉRIODE D'ILLUMINATION

Dans un chapitre précédent (¹), les phénomènes d'induction de la photosynthèse ont été étudiés à l'aide d'une méthode ampérométrique de dosage de l'oxygène dissous (², ³) présentant une grande rapidité

de réponse. On a pu mettre en évidence le phénomène qui a été découvert par BLINKS et SKOW (⁴) sur un matériel biologique différent et qui se traduit par une brusque émission d'oxygène pendant les premières secondes de la période d'illumination.

L'ensemble des résultats expérimentaux a conduit à admettre l'existence d'un complexe photochimique dont la concentration maximum est mesurée par la quantité d'oxygène produite pendant le jet initial. Pour de faibles intensités lumineuses, la vitesse d'émission d'oxygène pendant la période d'induction est limitée par la vitesse de régénération de ce complexe photochimique. Pour les fortes intensités, la rapidité de réponse de l'appareil n'est pas suffisante pour qu'il soit possible de mesurer avec précision les cinétiques transitoires des échanges d'oxygène.

Ces résultats sont en contradiction apparente avec les expériences d'EMERSON qui a mesuré la quantité d'oxygène dégagée à la suite d'un éclair électronique de très courte durée et d'intensité saturante. En effet la quantité d'oxygène émise à la suite d'un tel éclair est environ 10 fois plus faible que celle dégagée pendant le jet d'oxygène en lumière continue et donc paraît correspondre à une concentration du complexe photochimique dix fois plus faible.

Pour établir une liaison expérimentale entre les résultats d'EMERSON et les expériences portant sur les phénomènes d'induction, il est nécessaire d'étudier les cinétiques initiales d'émission d'oxygène dans un domaine d'intensité très étendu. Les mesures seront effectuées à l'aide d'une méthode éliminant les retards dus à l'inertie de l'appareil.

I. — Méthode des éclats lumineux.

On mesure la quantité d'oxygène produite à la suite d'un éclat lumineux de durée parfaitement déterminée. La même expérience est reproduite, dans des conditions expérimentales rigoureusement identiques, pour des éclats de durée différente, et on

porte sur un diagramme la quantité d'oxygène produite en fonction de la durée de l'éclat. Il est ainsi possible de reconstituer, point par point, la cinétique initiale d'émission d'oxygène. Cette méthode élimine totalement les retards dus à l'inertie du galvanomètre et à la diffusion de l'oxygène, des algues vers le milieu et du milieu vers l'électrode.

La quantité d'oxygène produite est mesurée par la différence d'ordonnées des courbes de respiration avant et après l'éclat, ce qui suppose que la vitesse de respiration n'a pas varié (fig. 1). L'existence des phénomènes d'extraoxydation ⁽¹⁾ introduit donc une certaine indétermination sur la valeur réelle de la quantité d'oxygène dégagée pendant l'éclat. Cette extraoxydation étant négligeable pendant la phase initiale du jet d'oxygène, celle-ci pourra toujours être étudiée dans des conditions satisfaisantes.

Les éclats lumineux sont produits par un ensemble de secteurs tournants. La durée des éclats, comprise entre 3 millisecondes et 2,5 sec, est contrôlée à l'aide d'un oscillographe cathodique. Pour interpréter les résultats obtenus par cette méthode, il faut tenir compte du fait que la quantité d'oxygène produite à la suite d'un éclat isolé est indépendante de la vitesse des réactions thermiques qui, à partir des produits primaires de la réaction photochimique, conduisent à l'émission

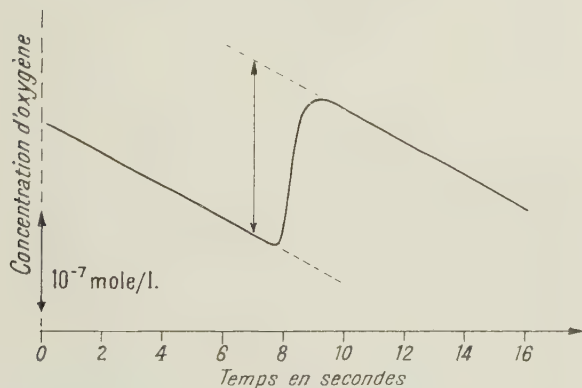


Fig. 1. — Mesure de la quantité d'oxygène produite par un éclat isolé.

Concentration des algues : 2 UA/ml. Concentration de chlorophylle : 0,076 g/l. Température : 4 °C. Durée de l'éclair : 0,05 sec. Volume d'oxygène dégagé : $1,75 \cdot 10^{-7}$ mole/l.

d'oxygène. En effet, ces réactions peuvent se terminer pendant la période d'obscurité qui suit l'éclat lumineux. La quantité d'oxygène produite sera déterminée exclusivement par la vitesse de la réaction photochimique et éventuellement par la vitesse de régénération du complexe photochimique. Il faut cependant remarquer que la vitesse des réactions thermiques comprises entre la réaction photochimique et l'émission d'oxygène peut intervenir s'il

existe une réaction inverse de la réaction photochimique détruisant les produits photochimiques quand ils s'accumulent en quantité notable.

II. — Expérience préliminaire.

1. *Jet d'oxygène en faible lumière* (fig. 2). — Dans l'expérience reproduite sur le diagramme 1 de

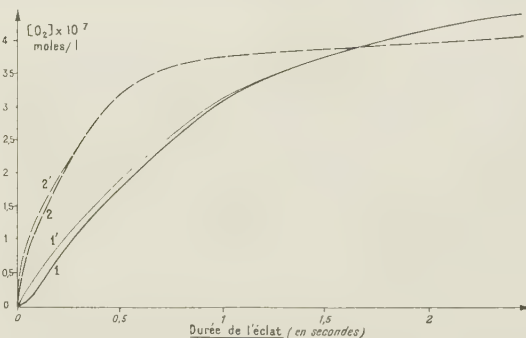


Fig. 2. — Cinétique de l'émission initiale d'oxygène obtenue par la méthode des éclats.

Les points expérimentaux correspondant aux éclats ne sont pas reportés pour ne pas surcharger le diagramme.

Concentration des algues : 2 UA/ml; concentration de chlorophylle : 0,080 g/l. Température : 4,5 °C. Intensité lumineuse : courbes 1 et 1' : 1 (unité arbitraire). Courbes 2 et 2' : 10. Courbes 1 et 2 : période d'obscurité précédant l'illumination supérieure à 1 h. Courbes 1' et 2' : algues soumises à une illumination préalable 3 sec. avant les éclats. (Durée de la préillumination 0,1 sec; intensité : 1.)

la figure 2, la durée des éclats est comprise entre 0,1 et 2,5 sec. L'extraoxydation est assez faible pour ne pas introduire d'erreur appréciable, même pour des éclats de longue durée. Il apparaît que la vitesse d'émission d'oxygène n'atteint pas immédiatement une valeur maximum. On observe nettement une phase d'activation dont la durée est de l'ordre de $1/10^6$ de seconde dans les conditions expérimentales de la figure 2 (courbe 1). La durée de la phase d'activation est généralement trop petite devant la période du galvanomètre pour qu'il soit possible de mettre ce phénomène en évidence par des mesures cinétiques continues analogues à celles qui ont été décrites dans un article précédent ⁽⁴⁾.

Dans l'expérience reproduite sur la courbe 1' de la figure 2, les conditions sont identiques mais les algues ont été préilluminées pendant $1/10^6$ de seconde, 5 sec avant l'éclat lumineux (même intensité lumineuse pendant la préillumination et pendant l'éclat). La phase d'activation disparaît, la vitesse atteint immédiatement une valeur maximum.

2. *Jet d'oxygène en forte lumière*. — Le phénomène d'activation est toujours visible mais beau-

coup plus rapide. La durée de la phase d'activation étant d'autant plus grande que l'intensité de la lumière est faible, on peut espérer pour de très faibles intensités lumineuses, observer le phénomène par mesure continue de la vitesse des échanges d'oxygène.

III. — Phénomène d'activation en très faible lumière (dosage continu).

L'existence d'une période d'activation apparaît d'une manière très nette quand on compare les cinétiques obtenues avec ou sans préillumination. La durée totale du phénomène est encore trop faible pour qu'il soit possible de faire des mesures précises, cependant on peut constater que la durée de la phase d'activation est d'autant plus courte que la lumière est plus intense (fig. 3).

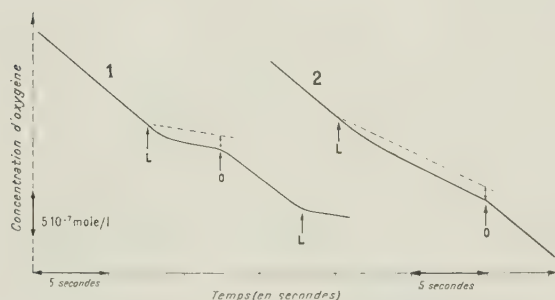


Fig. 3. — Réaction d'activation en très faible lumière.

Concentration des algues : 4 UA/ml. Concentration de chlorophylle : 0,22 g/l. Température : 2 °C. Intensité lumineuse : courbe 1 : $I = 1$. Courbe 2 : $I = 0,6$.

IV. — Étude des cinétiques initiales en fonction de l'intensité de la lumière (fig. 4).

1. *Présentation des résultats.* — Les expériences préliminaires qui viennent d'être décrites semblent indiquer que la phase initiale des cinétiques d'émission d'oxygène est principalement déterminée par une ou plusieurs réactions photochimiques. Afin de faire apparaître le caractère photochimique d'une cinétique, il est commode de représenter sur un même diagramme les courbes obtenues pour différentes intensités en utilisant une échelle de temps proportionnelle à l'intensité lumineuse. En d'autres termes, on porte en abscisse une longueur proportionnelle au produit $i \times t$ (i = intensité, t = durée de l'éclat), égale à la quantité de lumière émise pendant l'éclat. Dans une telle représentation, une cinétique purement photochimique se traduit par une courbe identique quelle que soit l'intensité lumineuse.

2. *Courbes obtenues sans préillumination.* — Pour les faibles intensités lumineuses (courbes I et II), les phases initiales des cinétiques sont parfaitement confondues. Pendant cette phase, une ou plusieurs réactions photochimiques sont donc seules limitantes. Pour les fortes intensités lumineuses, la vitesse de la réaction d'activation n'est plus proportionnelle à l'intensité lumineuse. La vitesse d'activation est alors limitée par une réaction thermique (courbe IV).

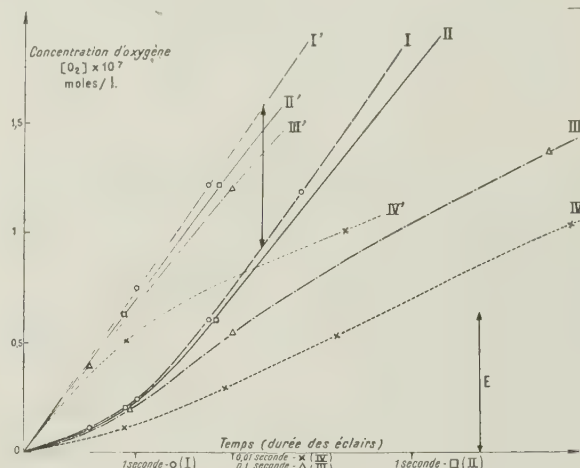


Fig. 4. — Effet de l'intensité lumineuse sur la phase initiale du dégagement d'oxygène.

Concentration des algues : 2 UA/ml. Concentration de chlorophylle : 0,076 mg/l. Température : 3 °C. Intensité de la lumière (unité arbitraire) : Courbes I et I' : 1. Courbes II et II' : 3,5. Courbes III et III' : 18,7. Courbes IV et IV' : 187.

La vitesse stationnaire de la photosynthèse pour l'intensité 1 correspond à 3 fois le point de compensation respiratoire.

Volume total du jet d'oxygène = $7,75 \cdot 10^{-7}$ mole/l. Volume d'oxygène dégagé à la suite d'un éclair électronique : $E = 0,6 \cdot 10^{-7}$ mole/l. Déficit de production d'oxygène consécutif au phénomène d'activation : $0,63 \cdot 10^{-7}$ mole/l.

3. *Courbes obtenues après préillumination.* — Toutes les courbes obtenues après préillumination ont une pente égale à l'origine. Cette pente mesure la vitesse maximum de la réaction photochimique. En faible lumière, cette vitesse est égale à la vitesse stationnaire d'émission d'oxygène. En forte lumière, la vitesse de la réaction photochimique décroît très rapidement.

4. *Mesure du déficit de production d'oxygène dû au phénomène d'activation.* — La différence d'ordonnée des courbes I et I' (dans la région où elles sont parallèles) mesure le déficit de production d'oxygène résultant de la nécessité d'une activation photochimique préalable. Il est indépendant de l'intensité lumineuse et correspond à $0,60 \cdot 10^{-7}$ mole/litre d'oxygène, soit $1/1400^e$ de la concentration de chlorophylle.

V. — Étude des cinétiques d'émission d'oxygène en fonction de la température (fig. 5).

1. *Faible lumière.* — Les courbes de la figure 5 correspondant à $I = 1$ sont confondues. Aucune réaction thermique ne limite donc la production d'oxygène au début de l'illumination.

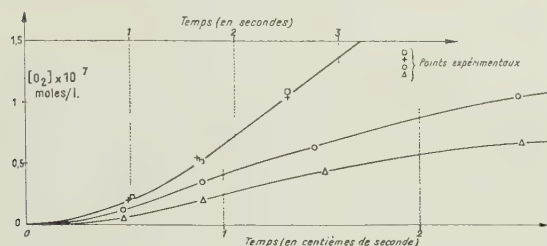


Fig. 5. — Effet de la température sur la phase initiale du dégagement d'oxygène.

Concentration des algues: 2 UA/ml. Concentration de chlorophylle: 0,076 g/l. Intensité de la lumière (en unités arbitraires) et température:

□ $I = 1$; 3 °C △ $I = 187$; 3 °C
+ $I = 1$; 16 °C ○ $I = 187$; 16 °C.

2. *Forte lumière.* — Le phénomène d'activation présente un fort coefficient de température, ce qui confirme les résultats précédents.

VI. — Éclairs électroniques.

Le montage optique réalisé pour éclairer la cellule électrochimique ne permet pas d'obtenir des intensités lumineuses supérieures à celles utilisées au cours des expériences précédentes. Seules des lampes à condensateurs ou lampes « flash » peuvent fournir des intensités instantanées nettement plus fortes. Étant donné que la durée de l'éclair est extrêmement courte et mal définie, la mesure de la production d'oxygène à la suite d'éclairs saturants peut seule apporter des résultats interprétables. Dans les expériences qui seront décrites ici, on étudiera les productions d'oxygène pour des éclairs isolés ou séparés par des intervalles d'obscurité assez longs (quelques secondes). Ces expériences sont analogues à celles effectuées par EMERSON⁽⁵⁾, avec cette différence que celui-ci ne pouvait mesurer la quantité d'oxygène produite pour un éclair isolé par suite de la sensibilité insuffisante de la méthode de dosage utilisée. Il étudiait donc la production d'oxygène consécutive à des séries d'éclairs, séparés par des périodes d'obscurité de l'ordre de la fraction de seconde. Dans ces conditions, l'énergie maximum des éclairs électroniques est beaucoup plus faible que dans le cas d'éclairs isolés.

Les éclairs produits par une lampe LAPORTE ont une énergie moyenne qui atteint 50 joules et une durée d'environ 100 microsecondes. Cette lampe est placée à 5 cm de la suspension d'algues, sans interposition de système optique. Les éclairs de grande puissance produisent un artéfact très violent, visible sur les enregistrements de concentration d'oxygène. Des expériences effectuées en l'absence d'algues, ou en présence d'algues tuées ou inhibées, ont montré que le bilan total de cet artéfact est nul (fig. 6).

Résultats expérimentaux.

1. *Éclairs isolés* intervenant après une longue période d'obscurité. On n'observe aucune production d'oxygène (fig. 6).

2. *Éclairs répétés* toutes les 5 à 10 sec. : A partir du deuxième éclair, on observe une production d'oxygène. La valeur de la quantité d'oxygène dégagée, déterminée au cours de l'expérience de la figure 6, correspond à $0,58 \cdot 10^{-7}$ mole/litre, soit 1/1 400^e de la concentration de chlorophylle, valeur légèrement supérieure à celle donnée par EMERSON (1/1 500^e à 1/2 500^e). On a vérifié que l'énergie des éclairs était saturante: l'interposition d'un filtre neutre absorbant 50 % de l'énergie incidente ne modifie pas la quantité d'oxygène produite. Cette quantité est indépendante de la température (expériences à 4° et à 16°).

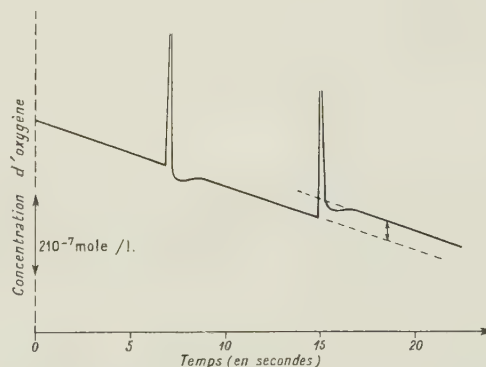


Fig. 6. — Effet d'éclairs lumineux de forte intensité sur les enregistrements de concentration d'oxygène.

Concentration des algues: 2 UA/ml. Concentration de chlorophylle: 0,067 g/l. 1^{er} éclair: on n'observe pas de production d'oxygène. 2^e éclair: quantité d'oxygène produite: $5 \cdot 10^{-8}$ mole/l.

La quantité d'oxygène dégagée à la suite d'un éclair saturant est sensiblement égale au déficit de production d'oxygène résultant de l'existence d'un phénomène d'activation en faible lumière (fig. 4). Cette égalité est vérifiée pour des algues cultivées dans des conditions très variées.

3. *Éclair intervenant quelques secondes après une période d'illumination de faible intensité.* — On observe une production d'oxygène identique à celle qui est mesurée dans le cas précédent.

L'ensemble de ces résultats laisse supposer que le système enzymatique dont la concentration détermine la quantité d'oxygène produite à la suite d'un éclair électronique est identique à celui qui limite la vitesse de production d'oxygène pendant la période d'activation.

L'absence de production d'oxygène à la suite d'un éclair isolé confirme l'existence d'une réaction thermique limitant la vitesse de la réaction d'activation, cette dernière n'ayant pas le temps de s'effectuer pendant la durée de l'éclair.

VII. — Désactivation.

La désactivation est suivie en mesurant la production d'oxygène provoquée par un éclair, en fonction de la durée de la période d'obscurité séparant cet éclair de la période de préillumination. La quantité d'oxygène produite diminue avec la durée de la période d'obscurité. Pour les algues étudiées dans l'expérience de la figure 6, la quantité d'oxygène produite diminue de moitié pour une période d'obscurité de 40 sec. Les effets d'une préillumination ne disparaissent complètement qu'après une période de 4 à 5 mn d'obscurité.

Les cinétiques de désactivation sont complexes et varient suivant les conditions de culture des algues.

VIII. — Interprétation.

En premier lieu, j'interpréterai les expériences portant sur le phénomène d'activation photochimique et sur l'effet des éclairs électroniques, sans tenir compte des résultats concernant les cinétiques d'induction en faible lumière décrits dans un chapitre précédent (1).

En second lieu, je proposerai des hypothèses susceptibles de rendre compte de l'ensemble des faits expérimentaux décrits dans ces deux articles.

1. Phénomènes d'activation et éclairs.

Notons d'abord que le phénomène d'activation dont il s'agit diffère de l'effet d'éclairs isolés qu'ont observé en anaérobiose ALLEN et FRANCK (15).

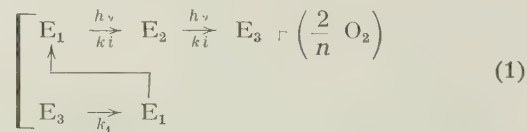
Les expériences correspondant aux figures 4 et 5 montrent que, en faible lumière et pendant la phase initiale de la période d'illumination, la vitesse d'émission d'oxygène est exclusivement limitée par des réactions photochimiques. Celles-ci comprennent au

moins une réaction d'activation et une réaction conduisant à la formation d'un précurseur de l'oxygène. On peut supposer qu'après une longue période d'obscurité, un centre photochimique doit absorber successivement deux quanta pour que soit formé un produit photochimique primaire, précurseur de l'oxygène. La combinaison d'un certain nombre de ces précurseurs, qui peuvent être issus de centres différents, conduit à la libération d'oxygène.

Deux possibilités doivent être envisagées :

1^{re} *hypothèse.* — La réaction photochimique nécessite l'accumulation de deux quanta sur un même centre photochimique. Une partie de l'énergie apportée par le premier quantum absorbé est emmagasinée par le centre photochimique (état métastable ou modification chimique du centre). Le second quantum absorbé provoque la réaction photochimique proprement dite et libère un produit photochimique primaire. De tels processus ont déjà été invoqués pour expliquer la possibilité de réactions photochimiques nécessitant une énergie supérieure à celle que peut apporter un seul quantum.

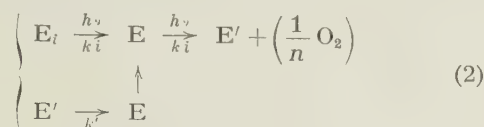
Si E_1 représente le centre photochimique à l'état fondamental, E_2 le centre ayant accumulé un quantum, E_3 les centres photochimiques qui ont réagi, n le nombre de photons nécessaires pour produire une molécule d'oxygène, cette hypothèse peut être représentée par les équations :



$\left(\frac{2}{n} O_2\right)$ représente le précurseur d'oxygène (il faut $n/2$ précurseurs pour produire une molécule d'oxygène). Dans cette hypothèse, les constantes de vitesse (k_i) des réactions photochimiques de formation de E_2 et E_3 sont identiques. En faible lumière et pendant la phase initiale du jet d'oxygène, la vitesse de la réaction thermique de régénération de E_1 est grande devant la vitesse de la réaction photochimique. Le schéma (1) doit être complété par la réaction de désactivation $E_2 \rightarrow E_1$ qui n'intervient pratiquement qu'à l'obscurité, sa vitesse étant négligeable devant la vitesse de la réaction photochimique.

2^e *hypothèse.* — Un seul quantum est suffisant pour provoquer la réaction photochimique, mais le centre photochimique est sous une forme inactive après une longue période d'obscurité. Le premier quantum absorbé réalise l'activation de ce centre, puis, la durée de vie de cette activation étant longue, chaque quantum absorbé effectue une réaction photochimique produisant un précurseur d'oxygène.

Si E_i représente les centres photochimiques sous la forme inactive, E les centres sous la forme active et E' les centres qui ont réagi, cette hypothèse peut se représenter par les équations :

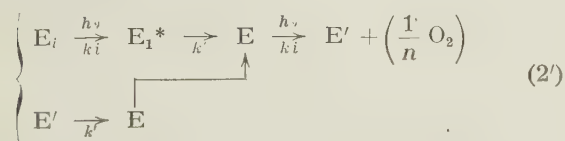
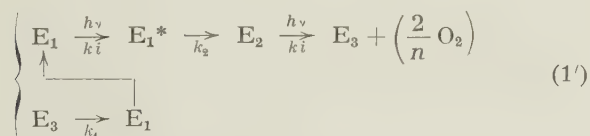


On suppose comme précédemment que la vitesse de régénération de E est suffisamment grande pendant le début de la période d'illumination en faible lumière, pour ne pas limiter la vitesse d'émission d'oxygène.

Les deux hypothèses qui viennent d'être proposées ne peuvent rendre compte que des cinétiques observées en faible lumière. En forte lumière, il apparaît que la vitesse d'activation est limitée par une réaction thermique (fig. 4 et 5). Il faut donc supposer que la réaction d'activation comporte successivement une phase photochimique et une phase thermique.

L'existence d'une réaction thermique d'activation explique également l'absence de production d'oxygène à la suite d'un éclair électronique de très courte durée.

Les équations (1) et (2) doivent être modifiées pour tenir compte de cette phase thermique du phénomène d'activation :



Les expériences qui ont été décrites ne permettent pas de déterminer la valeur des différentes constantes thermiques avec une précision suffisante. Cependant la connaissance de la valeur de ces constantes est inutile dans deux cas limites étudiés expérimentalement.

1. En faible lumière, les constantes de vitesse des réactions thermiques peuvent être considérées comme grandes devant la constante de vitesse photochimique, tout au moins pendant la phase initiale du jet d'oxygène.

2. En très forte lumière (éclairs électroniques), la vitesse des réactions thermiques est négligeable devant la vitesse de la réaction photochimique.

A partir de ces deux cas particuliers, il sera possible de confronter les résultats expérimentaux avec le calcul théorique effectué en partant de l'une et l'autre des deux hypothèses.

1^{re} hypothèse :

Faible lumière. — En faible lumière, les équations correspondant aux réactions (1') se ramènent au système différentiel :

$$\begin{cases} \frac{dx}{dt} = -ki.x + ki.(a-x) = ki.(a-2x) \\ \frac{d[O_2]}{dt} = \frac{2}{n} ki.x \end{cases}$$

a = concentration molaire des centres photochimiques.

x = concentration molaire des centres sous la forme E_2 .

(Il faut $n/2$ précurseurs d'oxygène pour produire une molécule d'oxygène). L'intégration de ce système, pour des algues préalablement conservées à l'obscurité, conduit aux équations (la lumière est établie au temps $t = 0$) :

$$\begin{cases} x = \frac{1}{2} a(1 - e^{-2kit}) \\ [O_2] = \frac{2}{n} a \left[\frac{1}{4} (e^{-2kit} - 1) + \frac{kit}{2} \right] \end{cases} \quad (I)$$

Ces équations montrent que, quand la phase transitoire est terminée, la moitié des centres photochimiques est sous la forme E_2 , puisque $x = \frac{1}{2} a$ pour t très grand, l'autre moitié sous la forme E_1 . Le déficit de production d'oxygène correspondant au phénomène d'activation (différence d'ordonnées entre les courbes obtenues avec ou sans préillumination) est égal à $\left(\frac{2}{n}\right)a \times \frac{1}{4}$.

Effet des éclairs. — Un éclair ne conduit à un dégagement d'oxygène que si les algues ont été illuminées au préalable. Si cette préillumination est réalisée en faible lumière, la quantité d'oxygène produite par un éclair doit être égale à $\left(\frac{2}{n}\right)a \times \frac{1}{2}$. En effet, après une telle préillumination, la moitié des centres photochimiques sont sous la forme E_2 , l'autre sous la forme E_1 . Si la préillumination est effectuée par un premier éclair, la quantité d'oxygène dégagée à la suite d'un second éclair doit être égale à $\left(\frac{2}{n}\right)a$ car dans ce cas, pendant le premier éclair, tous les centres photochimiques auront absorbé un quantum et seront donc sous la forme E_2 . Ces résultats sont en contradiction avec les faits expérimentaux qui montrent que la quantité d'oxygène produite par un éclair est constante, quel que soit le mode de préillumination, et que cette quantité est égale au déficit de production d'oxygène dû au phénomène d'acti-

vation en faible lumière. Cette première hypothèse ne peut donc être retenue.

2^e hypothèse.

Faible lumière. — Les équations correspondant aux réactions (2') se ramènent au système différentiel :

$$\begin{cases} \frac{dx}{dt} = ki(a - x) \\ \frac{d[O_2]}{dt} = \frac{1}{n} \cdot kix \end{cases}$$

a = concentration molaire totale des centres photochimiques.
 x = concentration molaire des centres sous la forme E.

L'intégration de ce système conduit aux équations :

$$\begin{cases} x = a(1 - e^{-kit}) \\ [O_2] = \frac{1}{n} a(e^{-kit} - 1 + kit) \end{cases} \quad (II)$$

Dans ce cas le déficit de production d'oxygène correspondant au phénomène d'activation est égal à $\left(\frac{1}{n}\right)a$.

Effet des éclairs. — La quantité d'oxygène produite à la suite d'un éclair intervenant après une illumination préalable (éclair ou faible lumière) sera égale à $\left(\frac{1}{n}\right)a$, l'ensemble des centres photochimiques étant sous la forme active E.

Cette hypothèse rend compte d'une manière satisfaisante des faits expérimentaux. La figure 7. repré-

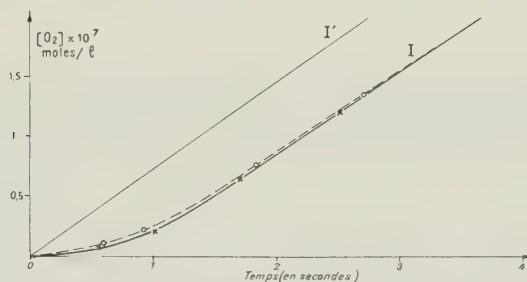


Fig. 7. — Comparaison des courbes expérimentales I et I' de la figure 4 avec la courbe théorique obtenue à partir de l'équation II.

Conditions expérimentales : voir figure 4.

× Courbe expérimentale.
 o Courbe théorique.

sente sur le même diagramme la courbe théorique obtenue à partir de l'équation (II) et la courbe expérimentale I de la figure 4. Les paramètres ki et a sont déterminés à partir des courbes I et I' de la figure 4. (ki = pente de la droite I', a = différence

d'ordonnées entre les courbes I et I'). Dans cette interprétation, on n'a pas tenu compte de la vitesse de désactivation qui est très petite par rapport aux vitesses photochimiques. Cependant, en très faible lumière, l'intervention de cette réaction conduit à une diminution apparente du rendement quantique de la photosynthèse.

2. Essai d'interprétation générale.

Les phénomènes d'activation et l'effet des éclairs s'interprètent d'une manière satisfaisante en admettant que le nombre des centres photochimiques est égal au nombre des molécules d'oxygène dégagées à la suite d'un éclair saturant (centre E d'EMERSON). Cette hypothèse est en contradiction avec l'interprétation des cinétiques d'induction en faible lumière dans laquelle on a supposé que le nombre des centres photochimiques est mesuré par le nombre de molécules d'oxygène dégagées pendant le jet initial d'oxygène (centres A). L'ordre de grandeur de ces deux quantités est nettement différent. Dans le cas de l'expérience de la figure 4, les quantités d'oxygène produites, rapportées à la quantité de chlorophylle, sont égales à 1/1 400^e pour un éclair électronique et à 1/110^e pour le jet initial d'oxygène.

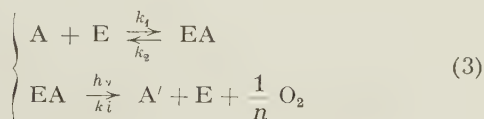
Ce problème est probablement identique à celui qui est posé par la contradiction apparente existant entre les expériences d'EMERSON et ARNOLD d'une part (5) et de TAMIYA d'autre part (6), portant sur l'étude de la photosynthèse en lumière intermittente. EMERSON et ARNOLD ont étudié la production d'oxygène de suspensions d'algues éclairées par une série d'éclairs électroniques séparés par des périodes d'obscurité plus ou moins longues. Ils ont montré 1° que la quantité d'oxygène produite par éclair atteignait, pour des valeurs croissantes de l'énergie des éclairs, une limite montrant un phénomène de saturation lumineuse. 2° Que la quantité d'oxygène produite par un éclair augmentait en fonction de la durée de la période d'obscurité séparant deux éclairs, jusqu'à atteindre une valeur limite indépendante de la température. Cette quantité d'oxygène est du même ordre de grandeur que celles qui ont été déterminées dans ce travail à la suite d'éclairs isolés (les valeurs trouvées par EMERSON correspondent en moyenne à 1/2 000^e de la concentration de chlorophylle). On obtient donc une confirmation intéressante des résultats d'EMERSON et ARNOLD dans des conditions expérimentales très différentes.

TAMIYA, reprenant les expériences d'EMERSON, a montré que la quantité d'oxygène dégagée par éclair pouvait être très supérieure à celle signalée par EMERSON, si l'énergie de l'éclair était augmentée dans de fortes proportions. Différents auteurs,

parmi lesquels KOK (7), ont confirmé à la fois les résultats d'EMERSON et ceux de TAMIYA. Ils ont montré que la contradiction apparente entre ces résultats provient du fait que TAMIYA utilisait des éclairs lumineux de durée beaucoup plus considérable, puisqu'ils étaient obtenus à l'aide d'un système de secteurs tournants et d'une source de lumière continue. Les expériences qui sont décrites ici conduisent à des résultats tout à fait analogues, la quantité d'oxygène dégagée à la suite d'un éclat variant entre deux limites, l'une correspondant aux valeurs données par EMERSON, l'autre correspondant au jet initial d'oxygène.

Pour interpréter l'ensemble des faits expérimentaux, je proposerai successivement deux hypothèses :

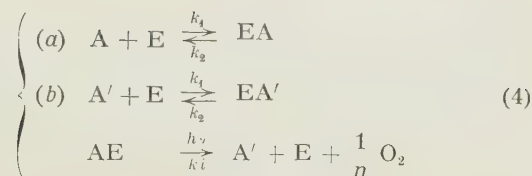
a) Dans la *première hypothèse*, on suppose que l'énergie absorbée par la chlorophylle est conduite, soit par des intermédiaires chimiques, soit par des transferts, vers les centres E d'EMERSON où s'effectue la réaction photochimique primaire. Cette hypothèse [voir schéma (2')] a permis d'interpréter l'effet des éclairs électroniques et les cinétiques d'émission d'oxygène dans les tout premiers instants de l'illumination, c'est-à-dire pendant la phase initiale du jet d'oxygène. Pour rendre compte de l'existence de ce jet d'oxygène, on peut supposer que la réaction de régénération du centre photochimique actif $E' \rightarrow E$ [voir schéma (2')] correspond à la fixation sur le centre E d'un substrat photochimique A, la concentration maximum de ce substrat étant mesurée par la quantité d'oxygène produite pendant le jet initial. Cette hypothèse peut être représentée par le schéma suivant :



On suppose

$$k_1 \gg k_2, \text{ et } [A] + [A'] + [EA] = c^{\text{te}}$$

Ce schéma n'est pas entièrement satisfaisant du point de vue cinétique. En effet, l'étude des cinétiques d'induction en faible lumière (1) montre que la vitesse d'émission d'oxygène est proportionnelle à la concentration de A et non pas à la concentration de EA comme il apparaît dans le schéma précédent. Il faut alors supposer que A et A' sont susceptibles de se fixer sur les centres E avec une même affinité. L'énergie photique absorbée par les centres EA' serait inutilisée et A' représenterait un inhibiteur par compétition du substrat photochimique A. Le schéma (3) doit être modifié pour tenir compte de cette nouvelle hypothèse :



Pour des intensités lumineuses suffisamment faibles, la vitesse d'émission d'oxygène sera bien proportionnelle à la concentration de A. En effet, on peut supposer que la constante de vitesse photochimique est alors petite devant les constantes thermiques k_1 et k_2 . Les réactions (a) et (b) du schéma (4) seront alors pratiquement à l'équilibre, ce qui conduit à la relation :

$$k_1[A][E] = k_2[EA]$$

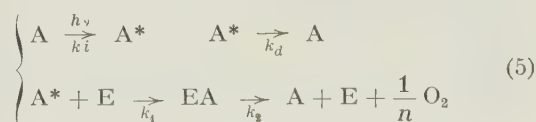
d'où

$$[EA] = \frac{k_1}{k_2} [E][A]$$

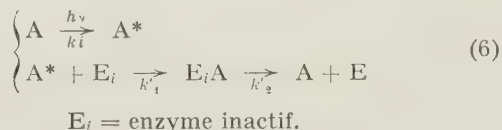
La concentration de E libre est constante, étant donné que la somme des concentrations de A et A' est constante et que les affinités de A et A' pour E sont identiques. Dans ces conditions, la concentration du complexe EA est proportionnelle à la concentration de A.

Pour interpréter les phénomènes d'activation et l'effet des éclairs électroniques, le schéma (2') reste toujours valable. Le schéma (4) donne simplement une représentation plus précise de la réaction de régénération des centres photochimiques.

b) Dans la *seconde hypothèse*, on suppose que l'énergie absorbée par la chlorophylle est conduite vers les centres A où se produit la réaction photochimique primaire. Pour expliquer l'effet des éclairs électroniques, on est conduit à construire une interprétation analogue à celle qui est généralement admise pour les expériences d'EMERSON et ARNOLD. Dans cette hypothèse, on suppose que E est une enzyme qui catalyse la stabilisation des produits photochimiques primaires. A la suite d'un éclair de très courte durée, une molécule de l'enzyme E ne peut réagir qu'avec une seule molécule d'un intermédiaire photochimique instable qu'il transforme en un intermédiaire stable. Les intermédiaires instables formés en excès sont détruits avant que l'enzyme E ait terminé le premier cycle de transformation. Si on admet que les centres A qui ont absorbé un photon représentent le premier intermédiaire photochimique instable, cette interprétation se traduit par les réactions :



En faible lumière, la vitesse de la réaction de stabilisation des produits photochimiques serait suffisante pour ne pas limiter la vitesse de production d'oxygène. Cette hypothèse ne tient pas compte de la nécessité d'une activation photochimique observée à la suite d'une longue période d'obscurité. Il est possible de représenter cette activation par les réactions :



En faible lumière, si l'on suppose que la valeur des constantes de vitesse thermiques est grande devant la constante photochimique et que $k_1 = k'_1$ et $k_2 = k'_2$, la vitesse de production d'oxygène sera proportionnelle à l'intensité de la lumière et à la concentration de E, alors que la vitesse d'activation sera proportionnelle à l'intensité de la lumière et à la concentration de E_i . On retrouve ainsi les résultats essentiels exprimés dans les schémas (2) et (2').

Quelle que soit l'interprétation choisie, les expériences portant sur les phénomènes d'activation et sur l'effet des éclairs isolés confirment l'importance fondamentale des centres enzymatiques, mise en évidence par EMERSON et ARNOLD. Il semble parfaitement justifié d'adopter la notion proposée par EMERSON d'une unité photosynthétique dont la concentration serait égale à celle des centres E. Les expériences de RABINOWITCH et EHRLMANTRAUT⁽⁸⁾ montrent que ces centres sont également impliqués dans le processus de production d'oxygène au cours de la réaction de HILL.

Une autre conclusion importante peut être tirée de l'ensemble de ces expériences. Il existe une relation stricte entre la quantité de lumière absorbée et la quantité d'oxygène produite. Cette relation peut être vérifiée aussi bien au début de la période d'illumination que pendant la photosynthèse stationnaire en faible lumière. Un nombre bien défini de produits photochimiques primaires se combinent donc ensemble pour donner naissance à une molécule d'oxygène. Étant donné que la réaction photochimique primaire ne comporte l'absorption que d'un seul quantum par un centre photochimique, il faut admettre que si P représente le produit photochimique primaire, l'ensemble des réactions conduisant à l'émission d'oxygène peut être schématisé sous la forme $nP \rightarrow O_2$.

Il faut remarquer que n représente le nombre de quanta qui doivent parvenir à un centre photochimique actif pour qu'une molécule d'oxygène soit produite. La mesure expérimentale du nombre de quanta absorbés par molécule d'oxygène produite

doit donner une valeur égale ou supérieure à n ; en effet, une certaine fraction des quanta absorbés peuvent être perdus, soit au cours des transferts de la chlorophylle vers les centres photochimiques, soit parce qu'ils sont absorbés par des molécules de chlorophylle qui ne sont pas en relation avec des centres actifs.

Les valeurs expérimentales du rendement quantique, qui sont généralement comprises entre 6 et 12 quanta par molécule d'oxygène, ne sont donc pas incompatibles avec un processus d'émission d'oxygène comportant l'absorption de 4 quanta par les centres photochimiques.

Les études cinétiques qui viennent d'être décrites ne permettent pas de déterminer sous quelle forme l'énergie absorbée par la chlorophylle est transmise aux centres photochimiques. La mesure simultanée de l'intensité de la fluorescence et de la vitesse d'émission d'oxygène permettra de montrer que cette concentration d'énergie se fait probablement par l'intermédiaire de transferts d'excitation entre les molécules de chlorophylle.

DEUXIÈME PARTIE

ÉTUDE SIMULTANÉE DE L'INTENSITÉ DE LA FLUORESCENCE ET DE LA VITESSE D'ÉMISSION D'OXYGÈNE

I. — Introduction.

De nombreux auteurs ont étudié les variations de l'intensité de la fluorescence des plantes chlorophylliennes pendant la période d'induction. KAUTSKY⁽⁹⁾ a montré que, dans certaines conditions, l'intensité de la fluorescence et l'activité photosynthétique varient d'une manière complémentaire.

En collaboration avec LAVOREL et DELOSME⁽¹⁰⁾, j'ai repris l'étude simultanée de l'intensité de la fluorescence et de la vitesse d'émission d'oxygène, en mettant à profit la grande rapidité de réponse de ma méthode de dosage ampérométrique. Je résumerai les principales conclusions de ce travail :

L'intensité de la fluorescence et la vitesse d'émission d'oxygène subissent des variations simultanées et de sens opposé. Cette relation est particulièrement nette pendant le jet initial d'oxygène (fig. 8). Elle reste valable quand l'activité photosynthétique est partiellement inhibée par une anaérobiose prolongée. Il est possible d'établir une relation quantitative exprimant la complémentarité entre l'inten-

sité de la fluorescence et la vitesse d'émission d'oxygène. Cette relation peut se mettre sous la forme :

$$P(t) + aF(t) = b,$$

$P(t)$ et $F(t)$ étant respectivement la vitesse d'émission d'oxygène et l'intensité de la fluorescence, a et b deux constantes positives dépendant des unités et des conditions expérimentales.

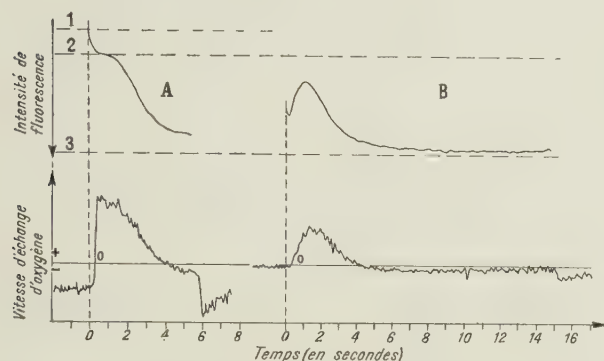


Fig. 8. — Étude simultanée de la vitesse d'émission d'oxygène et de l'intensité de la fluorescence.

Concentration des algues : 2 UA/ml. Température : 4 °C.
Vitesse maximum d'émission d'oxygène : $2 \cdot 10^{-7}$ mole/l/sec.
Courbe A : Concentration d'oxygène $5 \cdot 10^{-6}$ mole/l.
Courbe B : 5 mn anaérobiose.

1, 2, 3 : Valeurs approximatives des niveaux fondamentaux de l'intensité de la fluorescence.

La relation de complémentarité souffre deux exceptions importantes :

1) Pendant les premiers instants de la période d'illumination, on observe une croissance rapide de l'intensité de la fluorescence qui ne s'accompagne pas d'une émission d'oxygène correspondante (courbe A, fig. 8). Ce phénomène ne s'observe pas pour des algues préilluminées et semble donc en relation avec la réaction d'activation.

2) En forte lumière, il apparaît un écart à la loi de complémentarité, qui se développe progressivement après le premier minimum de vitesse. Cet écart se traduit par une diminution de l'intensité de fluorescence.

II. — Étude de l'intensité de la fluorescence au début de la période d'illumination.

1. Pour isoler la réaction d'activation photochimique, il est commode d'étudier la photosynthèse à de très faibles intensités lumineuses, les phénomènes d'induction proprement dits étant alors négligeables.

La mesure simultanée de la vitesse d'émission d'oxygène et de l'intensité de la fluorescence montre

que ces deux grandeurs varient parallèlement pendant la période d'activation, contrairement à ce qui s'observe pendant la période d'induction proprement dite (fig. 9). Une fois la période d'activation ter-

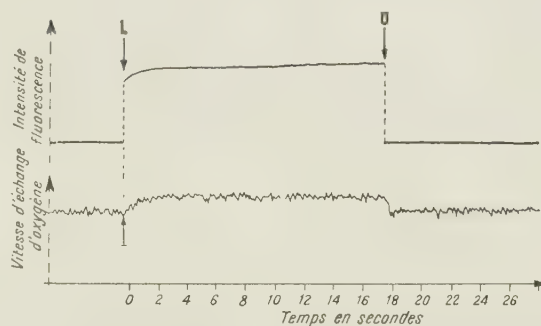


Fig. 9. — Étude simultanée de la vitesse d'émission d'oxygène et de l'intensité de la fluorescence, en très faible lumière.

Concentration des algues : 5 UA/ml. Concentration de chlorophylle : 0,22 g/l. Température : 2 °C (l'intensité de fluorescence croît dans le sens normal des ordonnées). L : lumière. 0 : obscurité.

minée, l'intensité de la fluorescence atteint une valeur stationnaire correspondant à une vitesse d'émission d'oxygène maximum. La figure 10

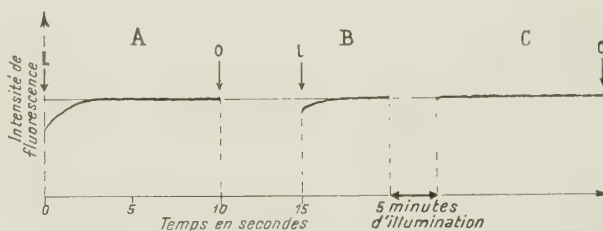


Fig. 10. — Variations de l'intensité de fluorescence en très faible lumière.

Concentration des algues : 2 UA/ml. Température : 2 °C.
L : lumière ; 0 : obscurité.

montre que la réaction de désactivation des centres E, qui s'effectue à l'obscurité, se traduit au moment du rétablissement de l'illumination par une diminution de la valeur initiale de l'intensité de la fluorescence (courbe B).

2. En conclusion, on peut définir trois niveaux fondamentaux de l'intensité de la fluorescence. Il est possible de distinguer ces trois niveaux sur les courbes de la figure 8.

1° Une valeur initiale minimum, qui s'observe après une longue période d'obscurité; le système photochimique est alors sous une forme inactive (niveau 1).

2° La valeur intermédiaire qui correspond à une vitesse maximum de l'émission d'oxygène (niveau 2).

3° Une valeur maximum correspondant à une vitesse d'émission d'oxygène nulle (niveau 3).

Entre les niveaux 1 et 2, intensité de fluorescence et vitesse d'émission d'oxygène varient parallèlement; au contraire entre les niveaux 2 et 3, ces deux grandeurs varient d'une manière complémentaire. En conséquence, la relation de complémentarité n'est vérifiée d'une manière stricte que pour des algues préilluminées pour lesquelles la réaction d'activation est terminée.

III. — Interprétation.

Ces expériences permettent de préciser certains aspects des phénomènes qui ont été décrits dans les chapitres précédents. Les variations de rendement de la fluorescence observées pendant la phase d'activation photochimique des centres E montrent que ceux-ci doivent être en relation étroite avec certaines molécules de chlorophylle. Il faut admettre la possibilité de transferts d'excitation entre ces molécules de chlorophylle et les centres E, ceux-ci représentant un piège plus ou moins efficace suivant l'état chimique dans lequel ils se trouvent. D'autre part, il a été établi dans le chapitre précédent que l'énergie absorbée par une molécule de chlorophylle quelconque est finalement transmise à un centre E. Il semble logique d'admettre que cette conduction d'énergie se fait par transferts d'excitation au sens de J. et F. PERRIN, et non par des intermédiaires chimiques. Cette hypothèse a été proposée par GAFFRON et WOHL⁽¹⁾ qui supposent que les molécules de chlorophylle sont suffisamment rapprochées pour que la probabilité de transfert d'excitation d'une molécule à une molécule voisine soit très grande. L'énergie absorbée par une molécule de chlorophylle serait ainsi susceptible d'être transférée de proche en proche jusqu'à ce qu'elle soit absorbée par un centre photochimique E; FÖRSTER⁽¹²⁾ puis DUYSSENS⁽¹³⁾ qui ont repris la théorie de PERRIN⁽¹⁴⁾, ont établi que cette hypothèse était admissible à condition que le nombre de molécules de chlorophylle par unité photosynthétique ne soit pas trop élevé (de l'ordre de 200).

Les conclusions des expériences portant sur la cinétique de la fluorescence pendant la période d'activation sont donc en accord avec la première des deux hypothèses proposées à la fin du chapitre précédent, c'est-à-dire que l'énergie absorbée par la chlorophylle est directement transmise aux centres E.

Quelles que soient les conclusions théoriques de ces expériences, il apparaît que la mesure de l'intensité de la fluorescence permet de suivre la cinétique des réactions photochimiques de la photosynthèse avec une résolution dans le temps très supérieure à celle des meilleures méthodes de dosage chimique.

Conclusions.

I. La cinétique des échanges d'oxygène pendant la phase initiale de la période d'illumination a été étudiée par une méthode éliminant les retards dus à l'inertie de l'appareil. Il a été possible de mettre en évidence: 1° que le système photochimique est sous une forme inactive après une longue période d'obscurité. 2° Que le système photochimique s'active rapidement à la lumière. La réaction d'activation comporte une phase photochimique et une phase thermique. Pour de faibles intensités lumineuses, seule la phase photochimique est limitante.

II. La grande sensibilité de la méthode de dosage a permis de mesurer la quantité d'oxygène produite à la suite d'un éclair électronique isolé de très courte durée et d'intensité saturante.

1° Pour un éclair électronique intervenant après une longue période d'obscurité, on n'observe pas de production d'oxygène.

2° Pour des algues préilluminées, on observe une production d'oxygène analogue à celle mesurée par EMERSON au cours de ses expériences en lumière intermittente.

3° La concentration de l'enzyme qui intervient dans la réaction d'activation est identique à celle de l'enzyme d'EMERSON.

III. On peut donner de l'ensemble de ces phénomènes une interprétation satisfaisante en supposant que l'énergie absorbée par la chlorophylle est transmise aux centres d'EMERSON où s'effectue la réaction photochimique.

Après une longue période d'obscurité, ces centres sont sous une forme inactive. Un premier quantum est nécessaire pour en réaliser l'activation. Ensuite chaque quantum absorbé par le centre effectue une réaction photochimique qui conduit à la formation d'un précurseur de l'oxygène.

IV. La mesure simultanée de la vitesse d'émission d'oxygène et de l'intensité de la fluorescence a montré que ces deux grandeurs variaient parallèlement pendant la période d'activation et d'une manière complémentaire pendant la période d'induction proprement dite.

Ces résultats laissent supposer que l'énergie absorbée par les molécules de chlorophylle est transmise aux centres E par des transferts d'excitation.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) P. JOLIOT. — *J. Chim. phys.*, 1961.
- (2) P. JOLIOT. — *C. R. Acad. Sci.*, 1956, **243**, 677.

- (3) P. JOLIOU. — *Thèse de Doctorat ès sciences*, Paris, 1960.
 - (4) L. R. BLINKS et R. K. SKOW. — *Proc. Natl. Acad. Sci. Washington*, 1938, **24**, 413.
 - (5) R. EMERSON et W. ARNOLD. — *J. gen. Physiol.*, 1932, **15**, 391 et **16**, 191.
 - (6) H. TAMIYA et Y. CHIBA. — *Studies from Tokyogawa Inst.*, 1949, **6**, n° 1, 2, 43.
 - (7) B. KOK. — in *Algal Culture*, de J. S. BURLEW, Carnegie Corp. Publ. n° 600, 11-6; 63-75.
 - (8) H. C. EHRLMANTRAUT et E. RABINOWITCH. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1952, **38**, 67.
 - (9) H. KAUTSKY et A. HIRSCH. — *Naturwissenschaften*, 1931, **19**, 964.
 - (10) J. LAVOREL, P. JOLIOU et R. DELOSME. — *C. R.*, 1959, **249**, 1409.
 - (11) H. GAFFRON et K. WOHL. — *Naturwissenschaften*, 1936, **24**, 81.
 - (12) T. FÖRSTER. — *Naturwissenschaften*, 1946, **33**, 166.
T. FÖRSTER. — *Ann. Physik.*, 1948, **2**, 55.
T. FÖRSTER. — *Angew. Chem.*, 1948, **60**, 163.
 - (13) L. N. DUYSSENS. — *Thèse Univ.*, Utrecht, 1952.
 - (14) F. PERRIN. — *Ann. Phys.*, 1932, **17**, 283.
 - (15) F. L. ALLEN et J. FRANCK. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1955, **58**, 124.
-

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION

CHAPITRE PREMIER

Techniques

<i>1^{re} Partie</i> : TECHNIQUE DE DOSAGE AMPÉROMÉTRIQUE DE L'OXYGÈNE	9
I. Choix d'une méthode	9
II. Principe des dosages ampérométriques de l'oxygène	9
III. Dosage ampérométrique appliqué aux mesures d'activité photosynthétique	10
IV. Description de l'appareil	12
V. Fonctionnement de l'appareil	13
VI. Appareillage auxiliaire	15
<i>2^e Partie</i> : CULTURE DES ALGUES	15
I. Conditions de culture	15
II. Dosage des algues	16
III. Vitesse de développement de la culture	16
<i>3^e Partie</i> : APPLICATION DE LA MÉTHODE AMPÉROMÉTRIQUE A L'ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ PHOTOSYNTHÉTIQUE	17
I. Mesure des vitesses d'échanges d'oxygène entre les algues et le milieu	17
II. Mesure des échanges d'oxygène dans les différentes conditions expérimentales	17
<i>Bibliographie</i>	19

CHAPITRE II

Cinétique d'induction de la photosynthèse chez *Chlorella pyrenoidosa*.

I. Étude des phases transitoires de la photosynthèse consécutives à une variation de l'éclairement	20
Résumé	20
<i>1^{re} Partie</i> : ÉTUDE DES ALGUES EN PÉRIODE DE PHOTOSYNTHÈSE STATIONNAIRE	21
I. Introduction	21
II. Résultats expérimentaux	21
<i>2^e Partie</i> : PHÉNOMÈNES D'INDUCTION DE LA PHOTOSYNTHÈSE	22
I. Introduction	22
II. Caractéristiques essentielles des cinétiques d'induction	23
III. Variations de l'éclairement pendant la période d'induction	25
IV. Influence des conditions de culture	27
V. Influence de quelques facteurs sur les cinétiques d'induction	28
VI. Interprétation	31
<i>Conclusions</i>	33
<i>Bibliographie</i>	33

CHAPITRE III

Cinétique d'induction de la photosynthèse chez *Chlorella pyrenoidosa*.

II. Cinétique d'émission d'oxygène et fluorescence pendant la phase initiale d'illumination	34
Résumé	34
<i>1^{re} Partie</i> : ÉTUDE DE LA CINÉTIQUE DE L'ÉMISSION D'OXYGÈNE PENDANT LA PHASE INITIALE DE L'ILLUMINATION	34
I. Méthode des éclats lumineux	34
II. Expérience préliminaire	35
III. Phénomène d'activation en très faible lumière (dosage continu)	36
IV. Étude des cinétiques initiales en fonction de l'intensité lumineuse	36
V. Étude des cinétiques d'émission d'oxygène en fonction de la température	37
VI. Éclairs électroniques	37
VII. Désactivation	38
VIII. Interprétation	38
<i>2^e Partie</i> : ÉTUDE SIMULTANÉE DE L'INTENSITÉ DE LA FLUORESCENCE ET DE LA VITESSE D'ÉMISSION D'OXYGÈNE	42
I. Introduction	42
II. Étude de l'intensité de la fluorescence au début de l'illumination	43
III. Interprétation	44
<i>Conclusions</i>	44
<i>Bibliographie</i>	44

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

« Possibilités offertes par la diffusion de la lumière pour l'étude des macromolécules biologiques. »

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 25 juin 1960.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. PÉRÈS

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

JEAN SARRAILH

IMPRIMÉ PAR L'IMPRIMERIE DURAND, RUE FULBERT, CHARTRES (E.-ET-L.) FRANCE (1961).
